SÉRIE A, N° 4446
N° D'ORDRE : 5294

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Maria Juana ESCRIBANO DE GORDO
(née CRESPO-LOPEZ)

PREMIÈRE THÈSE

Étude des protéines du sérum de rat normal

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Structure des protéines

Soutenues le 19 Janvier 1965 devant la Commission d'examen

M^elle^ LE BRETON — *Président*

MM. DUBERT, GRABAR — *Examinateurs*

OUVRAGE PUBLIÉ AVEC LE CONCOURS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SÉRIE A, N· 4446
N· D'ORDRE : 5294

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Maria Juana ESCRIBANO DE GORDO
(née CRESPO-LOPEZ)

PREMIÈRE THÈSE

Étude des protéines du sérum de rat normal

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Structure des protéines

Soutenues le 19 Janvier 1965 devant la Commission d'examen

M^elle^ LE BRETON — *Président*

MM. DUBERT, GRABAR — *Examinateurs*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... M. ZAMANSKY

MM.	G. JULIA	T Analyse supérieure & algèbre supérieure
	PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée
	GRASSE	T Evolution des êtres organisés
	PREVOST	T Chimie organique
	WYART	T Minérolo & Cristal.
	TEISSIER	T Zoologie
	MANGENOT	T Biol. Végét. (Orsay)
	AUGER	T Physique quantique et relativité
	MONNIER	T Physiologie générale
	PIVETEAU	T Paléontologie
	ROCARD	T Physique (ENS)
	CARTAN	T Mathématiques (ENS)
	LAFFITTE	T Chimie générale
	FAVARD	T Géométrie supérieure
	COULOMB	T Physique du globe
Mlle	COUSIN	T Biol. animale (SPCN)
	CHRETIEN	T Chimie minérale
	DRACH	T Zoologie
	KASTLER	T Physique ENS
	EPHRUSSI	T Génétique
	RIVIERE	T Géol. SPCN & Sédimentologie (Orsay)
	GAUTHERET	T Biologie Vég. (PCB)
	R. LUCAS	T Recherches Physiques
	A. THOMAS	T Biologie cellulaire
	ARNULF	T Optique appliquée
	MORAND	T Physique Enseignement
	SOLEILLET	T Physique (PCB)
	FORTIER	T Mécanique Exp. des Fluides
	PETIT	T Biologie maritime
	QUENEY	T Météor. & dynamique atmosphérique
	GALLIEN	T Embryologie
	EICHHORN	T Botanique
	DE CUGNAC	T Biologie Vég. (SPCN)
Mlle	CAUCHOIS	T Chimie Physique
	THELLIER	T Physique du globe
	L'HERITIER	T Biol. générale (Orsay)
	GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)
	PONCIN	T Mécanique générale
	DUBREIL	T Arithm. & Théorie des Nombres
	QUELET	T Chimie organique
	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
	CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.
	CUVILLIER	T Micropaléontologie
	JUNG	T Géologie
	TRILLAT	T Miscroscopie et diffraction électro.
	WIEMANN	T Chimie organ. & struc.
	JACQUINOT	T Spectroscopie & Phys. céleste (Orsay)
	VASSY	T Physique de l'Atmosph.
	DESTOUCHES	T Théories Physiques
	AMIEL	T Chimie générale
	HOCART	T Minéralo & Cristallo.
	J.P. MATHIEU	T Physique Optique
	COUTEAUX	T Cytologie
	MAY	T Zoologie (Orsay)
	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
	FELDMANN	T Biologie végét. marine
	GUINIER	T Physique des Solides (Orsay)
	JOST	T Physiologie comparée
	FORTET	T Calcul des Probabilité et Phys. mathémat.
	SCHWARTZ	T Calcul diff. & Intégral
	CHOUARD	T Physiologie végétale
	MALAVARD	T Aviation (Tech. Aéron.)
	BRELOT	T Calcul diff. & Intégr.
	NORMANT	T Synthèse organique
	BENARD	T Chimie minérale
	BUVAT	T Botanique (ENS)
	DUGUE	T Statistiques Mathém.
	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
	ULRICH	T Physiol. Vég. Appliq.
	MARECHAL	T Optique théor. & Appli.
	KIRRMANN	T Théories chimiques
	CHADEFAUD	T Botanique
Mlle	LE BRETON	T Physiol. de la Nutrit.
	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie
	DEVILLERS	T Anatomie & Hist. Compar.
	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
	FRANCON	T Physique (SPCN)
	GLANGEAUD	T Géographie Phys. & Géol.
	GODEMENT	T Mathématiques (MGP)
	PISOT	T Tech. Math. de la Phys.
	ROCH	T Géologie
	SCHATZMANN	T Astrophysique
	TERMIER	T Géologie générale
	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
	LENNUIER	T Physique (MGP)
	RIZET	T Génétique (Orsay)
	ROUTHER	T Géologie appliquée
Mme	TONNELAT	T Physique théorique
	DIXMIER	T Mathématiques (MPC)
	SOUCHAY	T Chimie générale
	AIGRAIN	T Electrotechnique générale
	BRUSSET	T Chimie systématique
	M. IEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme	CHAIX	T Chimie biologique
Mme	HUREL-PY	T Biologie végét. (PCB)
	PIAUX	T Chimie (MPC)
	BRUN	T Mécanique théorique des fluides
	LEDERER	T Chimie biolog. (Orsay)
Mme	DUBREIL	T Mathématiques (Agrég.)
Mme	LELONG	T Mathématiques II (ENS)
	BELLAIR	T Géologie (SPCN)
	COTTE	T Physique électricité
	J.E. DUBOIS	T Chimie organique
	LAMOTTE	T Zoologie (ENS)
	A. MICHEL	T Chimie minérale (Orsay)
	OLMER	T Energétique générale
	ROUAULT	T Electricité (Orsay)
	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
	BARCHEWITZ	T Chimie Physique
	BROSSEL	T Physique atomique
	BUSER	T Physiologie comparée
	CAMUS	T Physiologie Vég. (Orsay)
	CASTAING	T Physique II Thermo (Orsay)
	CURIEN	T Minéralo & cristallo.
	MOYSE	T Physiol. Végét. (Orsay)
	NOIROT	T Evolution des Etres Org.
	PANNETIER	T Chimie générale
	POSSOMPES	T Zoologie
	PULLMANN	T Chimie quantique
	TEILLAC	T Physique Nucl. & Radioactivité (Orsay)
	TONNELAT	T Biol. Physico-chim (Orsay)
	VILLE	T Econométrie
	WILLEMART	T Chimie PCB
	DODE	T Chimie (Orsay)
	FREYMANN	T Recherches Physiques
MM	GUINOCHET	T Biol. Vég. SPCN (Orsay)
	ROLLET	T Chimie minérale
Mlle	JOSIEN	T Chimie SPCN
	CHEVALLEY	T Géométrie algéb. et théorie des groupes
	ARNOULT	T Electronique (Orsay)
	CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
	DENY	T Mathématique Géné (Orsay)
	GERMAIN	T Mécanique théor. des fluides
	G. LUCAS	T Géologie
	ALLARD	T Chimie Physique
	BERTHELOT	T Phys. des particules Fondamentales (Orsay)
	BRICARD	T Météor. et Physique de l'Atmosphère
Mme	ALBE-FESSARD	T Psycho-physiol.
	FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
	M. JULIA	T Etudes des Molécules complexes
	LENDER	T Biol. Animale SPCN- (Orsay)
	MAGAT	T Physico-Chimie des radioéléments
Mlle	QUINTIN	T Electrochimie
	MONOD	T Chimie du métabolisme
	BENOIT	T Physiol. animale (Orsay)
	DE POSSEL	T Analyse numérique
	CHARLOT	T Chimie analytique
	LEMEE	T Ecologie Vég. (Orsay)
	GUERIN	T Chimie MPC (Orsay)
	M. CHATELET	T Chimie PCB
	JEAN	T Physique Nucl. (Orsay)
	MATTLER	T physique SPCN
	BERGERARD	T Zoologie (Orsay)
	BERTEIN	T Electronique (Orsay)
	BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme	COUTURE	T Thermo & Méca. Physique
	ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du globe
	FRANC	T Biologie animale PCB
	SCHNELL	Botanique tropicale
	STOLKOWSKI	T Physiologie végétale
	ACHER	T Chimie Biologique
	BAUDOIN	Biologie animale PCB
	BEAUMONT	Biologie animale SPCN
	BLAMONT	T Géophysique-ionosphère
	BOURREAU	T Botanique
	D. CURIE	Physique MGP
	DURAND-DELGA	T Géologie
	FREON	T Chimie organique (Orsay)
	HELLER	T Physiol. végétale
	TORTRAT	T Calcul des Probabilités
	CAILLEUX	T Géologie (SPCN)
	MAGNAN	T Physique SPCN
	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la chimie
		Théor. & à la Phys. Nucléaire.
Mlle	FOURCROY	Biologie végét. SPCN
Mme	CHOQUET-BRUHAT	T Mécan. Analytique et Méca. céleste.
Mlle	VEIL	T Physiologie générale
	LWOFF	T Microbiologie
	SIESTRUNCK	T Mécan. Phys. & Expérim.
	LACOMBE	T Métallurgie des métaux Nucléaires (Orsay)
	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)
	CABANNES	T Mécanique générale
	LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay)
	MAZET	T Méca. générale (Orsay) Géographie
		phys. et Géol. Dynamique
	COMOLET	T Mécanique des Fluides
	CORABOEUF	T Physiol. animale (Orsay)
	DELLOUE	Physique de l'exosphère
	GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
	HOUILLON	Biologie animale PCB
	J. JULLIEN	Chimie SPCN (Orsay)
	MALGRANGE	T Technique Math. de la Physique (Orsay)
	OLIVIER	Antropologie
	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
	BLANC-LAPIERRE	T Phys. ENS (Orsay)
	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
	KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
	SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines
	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
	THIRY	T Mécanique céleste
	ABELES	Physique SPCN
	AMAT	T Physique PCB
	AUBOIN	T Géologie
Mme	BENOIT-GUEUTAL	T Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay)
	BOUGIS	Biologie marine (Villefranche/Mer)
	BRUHAT	T Mathématiques MPC
	BRUNN	T Géologie historique (Orsay)
	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
	DEHEUVELS	T Mathématique Propé.
	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
	FURON	T Géologie SPCN
Mme	GANS	T Génétique
	GENEVES	Biologie végétale PCB
	GUILBERT	Physique (CUS Orléans)
	HUPE	T Pétrographie
	HOLLANDE	T Biologie générale
	LIONS	T Analyse numérique
	MAITTE	T Chimie PCB
	MEYER	Physique propédeutique
	NICOLAS	Géologie appliquée
	PANIGEL	Biologie générale
	RAVIER	Pétrographie
	ROSEAU	T Méca. théor. des fluides
	ROUBINE	T Electronique
	SILBER	T Chimie PCB
	UEBERSFELD	T Electronique
	YVON	T Théories Physiques
	HERVE	T Mathématiques
	NERON	T Mathémat. MPC (Orsay)
Mme	PECKER-WIMEL	T Astrophysique
	BALKANSKY	Physique MPC
	LE CORRE	T Electricité
	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
	GOURDIN	Phys. Théor. des Hautes Energies (Orsay)
	LEHMANN	T Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay)
	NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
	ECHALIER	Biologie animale PCB
	BARRAUD	Physiologie cellulaire
	LIORET	Physiologie végét. Orsay
	DARS	Géologie struc. & Géol. appliquée
	CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
	BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
	ARNOUS	T Physique théorique
	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
	MALLIAVIN	T Mathématique propé. Orsay
	GAUDEMAR	Chimie Propéd.
	PEREZ Y JORBA	Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay)
	DAVID	T Chimie (Agrég. Orsay)
	BROUSSE	T Mécanique théorique

Secrétaire Général..... R. POULLAIN

Maria Juana ESCRIBANO DE GORDO
(née CRESPO LOPEZ)

"ETUDE DES PROTEINES DU SERUM DE RAT NORMAL"

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0065

A MONSIEUR JACQUES TREFOUEL
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

En témoignage de notre reconnaissance pour l'autorisation de travailler à l'Institut Pasteur et de profiter du matériel et des installations qui nous ont été nécessaires.

A MONSIEUR PIERRE GRABAR
DIRECTEUR DE L'INSTITUT DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES SUR LE CANCER DU C.N.R.S. A VILLEJUIF

CHEF DU SERVICE DE CHIMIE MICROBIENNE A L'INSTITUT PASTEUR

En témoignage de notre profonde reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé dans son Service ainsi que pour les précieux conseils qu'il nous a toujours prodigués et pour l'affection qu'il n'a cessé de nous témoigner.

A MADEMOISELLE LE BRETON

PROFESSEUR A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

DIRECTEUR DU CENTRE DE RECHERCHES SUR LA CELLULE NORMALE ET CANCEREUSE DU C.N.R.S. A VILLEJUIF

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et qui nous a prodigué de précieux conseils au cours de ce travail.

en témoignage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR DUBERT

PROFESSEUR A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

qui a bien voulu s'intéresser à notre travail

en témoignage de notre reconnaissance.

Nous sommes très reconnaissants au Dr. José Uriel qui nous a initiée aux diverses techniques immunochimiques et dont l'aide nous a été très précieuse lorsque nous avons débuté ce travail.

Nous remercions Madame M. Kaminski qui nous a conseillée pour la rédaction de ce travail.

Nous remercions très chaleureusement tous nos collègues et camarades de l'Institut Pasteur qui, par leurs conseils, leur aide et leurs encouragements, ont contribué à ce travail, en particulier Melle Janine Courcon.

Nous remercions tout particulièrement Melle Guadelupe Velez-Pratt dont la collaboration nous a été très utile pour une partie de ce travail ainsi que Mme Jocelyne Cordier pour son aide technique compétente et Mr. Marcel Challeil qui a immunisé, pour nous, les animaux.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MON MARI ET MES ENFANTS

A MES AMIS

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	11
PREMIER CHAPITRE	15
I - MATERIEL	15
1/ Les sérums de Rats	15
2/ Les Hémolysats de globules rouges	15
3/ Les Immunsérums	15
II - METHODES	17
1/ Electrophorèse sur gel de gélose (E.G.) et analyse immuno-électrophorétique (A.I.E.)	17
2/ Délimitation des zones d'électrophorèse et calcul des pourcentages protéiques	18
3/ Calcul des mobilités des protéines	18
4/ Caractérisation des protéines par des colorations spéciales	19
5/ Méthodes immunochimiques permettant l'identification des protéines	20
6/ Détermination quantitative des protéines	20
7/ Fractionnement du sérum par chromatographie sur colonnes de cellulose	20
8/ Electrophorèse et analyse immunoélectrophorétique dans les tampons véronal et carbonate pH 9,2	21
9/ Obtention des α_1-globulines et de l'albumine par électrophorèse préparative	22
10/ Fractionnement du sérum de rat par l'acétate cuivrique	22

Pages

DEUXIEME CHAPITRE. - RESULTATS DE L'ELECTROPHORESE ET DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DU SERUM DE RAT NORMAL 25

1/ Electrophorèse et analyse immunoélectrophorétique en tampon véronal 0,05 M pH 8,2. Nomenclature des protéines . 25

2/ Caractérisation des protéines par des colorations spéciales, après électrophorèse et analyse immunoélectrophorétique . 29

3/ L'électrophorèse et l'analyse immunoélectrophorétique dans d'autres tampons 30

TROISIEME CHAPITRE. - RESULTATS DU FRACTIONNEMENT DU SERUM DE RAT 37

1/ Fractionnement sur colonne de D.E.A.E.-cellulose 37

2/ Chromatographie sur CM-cellulose. Caractérisation de la céruloplasmine 39

3/ Fractionnement par précipitation par l'acétate cuivrique .. 42

QUATRIEME CHAPITRE. - ETUDE INDIVIDUELLE DE QUELQUES PROTEINES 45

1/ Chromatographie de la fraction B du précipité cuivrique sur D.E.A.E.-cellulose ; étude des γ-globulines 45

2/ Préparation et étude de la sidérophiline 49

3/ Caractérisation de l'haptoglobine. Etude du complexe hémoglobine-haptoglobine 51

4/ Etude des α_1-globulines 53

CINQUIEME CHAPITRE. - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS 59

1/ Discussion 59

2/ Conclusions 63

BIBLIOGRAPHIE 67

INTRODUCTION

Nous avons entrepris ce travail dans le but de dénombrer et de caractériser les protéines du sérum de Rat normal. L'importance du Rat en tant qu'animal d'expérience souligne, en effet, l'intérêt d'une connaissance des constituants protéiques des liquides biologiques de cet animal, et, en tout premier lieu, de ceux du sérum sanguin.

Divers auteurs ont déjà étudié le sérum de Rat à l'aide de techniques diverses. Ainsi, Levin et Leathem en 1942 (28), Moore, Levin, Leathem en 1944 (31), Erlang Gjessing, Chanutin (8) ont réalisé l'électrophorèse en veine liquide selon Tiselius (43) de sérums de rats normaux et comparé avec l'électrophorèse de sérums de rats thymectomisés dans lesquels ils observent d'importantes variations protéiques. Grabar et Courcon (13) en 1958 ont effectué l'analyse immunoélectrophorétique (A.I.E.) de sérums de rats normaux et comparé avec l'A.I.E. du sérum d'autres animaux. En utilisant également l'A.I.E., Arnason, de Vaux St. Cyr et Grabar en 1963 (2) ont précisé la nature des anomalies observées dans les sérums de rats thymectomisés. Ces auteurs ont comparé leurs résultats obtenus après l'A.I.E. avec ceux que nous avions eus en utilisant cette même méthode (11). Neahus, Havez et Biserte en 1962 (33) ont fait une étude des constituants protéiques du sérum de rat normal, à l'aide de techniques diverses, dans le but d'expliquer les variations protéiques observées à la suite de certains traumatismes locaux (Neahus, Balegno, Chandler en 1961 (32), Darcy en 1960 (5), Robert, Robert et Jayle en 1959 (37)). En effet, une interprétation correcte de toutes ces anomalies ne saurait être évidemment envisagée sans connaître tout d'abord les protéines des sérums normaux.

Dans notre travail, nous avons tenté d'élargir le domaine des connaissances déjà acquises sur les protéines sériques du Rat.

Il est évident que la nature même du matériel de travail ne simplifie pas une telle étude. En effet, comme l'ont observé Enselme et coll. (7) qui ont fait une étude statistique des électrophorèses du sérum de divers rats, la mobilité des pics ainsi que la teneur en protéines varient d'un animal à l'autre, en rapport avec l'age ou le sexe de l'individu ; il est évident qu'il y a d'autres variables à considérer, par exemple, la race, le régime alimentaire, etc. Autrement dit, une étude rationnelle impliquerait la comparaison des sérums des animaux, compte tenu de ces variables, après avoir établi la constitution protéique complète d'un sérum dans des conditions déterminées. Or rien que ceci est un problème très compliqué puisque le nombre de protéines qui rentrent dans la composition d'un sérum est très élevé. En tenant compte de ces considérations, nous nous sommes efforcés dans notre travail : 1/ de déceler le plus grand nombre possible de constituants ; 2/ de

les définir par une ou plusieurs propriétés et enfin, 3/ d'étudier plus particulièrement les protéines les plus importantes ou les plus caractéristiques, soit en les isolant, soit en les mettant en évidence par une propriété typique. Dans cet esprit, nous avons toujours travaillé avec des "pools" de sérum d'une dizaine d'individus, prélevés dans les mêmes conditions et ceci avec des rats de même race.

Les connaissances actuelles sur les protéines sériques humaines et, surtout, le développement considérable des méthodes de travail dans le domaine de l'étude des protéines ont beaucoup facilité notre travail. Parmi ces méthodes, nous avons utilisé :

- l'électrophorèse en gel de gélose et l'analyse immunoélectrophorétique selon Grabar et Williams (17),

- la caractérisation directe des protéines après électrophorèse ou immunoélectrophorèse,

- la chromatographie sur colonne de cellulose d'après Sober et Peterson (41). Cette dernière méthode étant aujourd'hui suffisamment connue, nous ne la décrivons pas ici.

Les colorations spécifiques, réalisées directement sur les plaques, permettent de caractériser les protéines par deux propriétés dans le cas de l'électrophorèse et par trois dans le cas de l'analyse immunoélectrophorétique. Elles mettent à profit soit une propriété chimique, soit une activité enzymatique et seront décrites au fur et à mesure de leur utilisation. Quant à l'analyse immunoélectrophorétique, bien qu'elle soit aujourd'hui connue, nous en rappelons ici le principe en raison de son caractère spécial puisqu'elle fait appel à la propriété antigénique des protéines : après avoir effectué une électrophorèse sur gel de gélose, on découpe une rigole parallèle à la migration et tout au long de celle-ci ; dans cette rigole, on dépose un immunsérum spécifique du mélange des protéines à étudier. Dans ces conditions, et dans la mesure où l'immunsérum contient des anticorps contre toutes les protéines du mélange, des arcs de précipitation sont formés, pour chacun des constituants antigéniques. Les principaux avantages de cette méthode sont sa spécificité et sa sensibilité. Grâce à sa spécificité, liée à la nature même de la réaction antigène-anticorps, on décèle même les protéines ayant la même mobilité, ce qui est particulièrement le cas de certaines protéines du sérum de Rat, comme l'ont signalé Grabar et Courcon (13). Seul un concours de circonstances exceptionnelles (protéines ayant la même mobilité, la même constante de diffusion et dont le rapport antigène-anticorps est le même), donne lieu à la formation de lignes de précipitation superposées (12). Grâce à la sensibilité de cette méthode, quelques microgrammes de substances seulement peuvent être mis en évidence, par conséquent les constituants mineurs.

Le principal inconvénient de l'A.I.E. qui réside dans la variabilité de la teneur en anticorps des immunsérums peut être minimisé si l'on fait appel à l'utilisation de plusieurs immunsérums.

D'autre part, pour tirer le meilleur parti de cette méthode, il est convenable d'établir, pour chaque immunsérum, les meilleures conditions d'utilisation, c'est-à-dire les concentrations respectives de l'antigène et de l'anticorps, ainsi que le rapport antigène-anticorps et la distance du réservoir de l'électrophorèse à la rigole des anticorps. Il est évident que les protéines qui n'ont pas donné lieu à la formation d'anticorps ne sont pas décelées ;

c'est pourquoi il est convenable d'effectuer parallèlement une électrophorèse simple, les deux méthodes se complétant heureusement.

Ce sont ces méthodes que nous avons surtout utilisées dans notre étude du sérum de Rat mais, parfois, elles n'ont pas été suffisantes et nous avons dû faire appel à d'autres techniques comme par exemple l'électrophorèse préparative (27), le relargage par le sulfate d'ammonium et la technique de précipitation par l'acétate de cuivre mise au point par nous pour la précipitation des γ-globulines du sérum humain (9).

Toutes ces méthodes ayant été développées pour l'étude du sérum humain, il est parfois mentionné dans notre texte que nous avons eu recours à la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec le sérum humain. Cependant, nous n'avons pas cherché à faire une étude parallèle entre ces deux sérums mais, au contraire, nous nous sommes efforcés d'étudier principalement les particularités du sérum de Rat.

Nous avons divisé notre exposé en cinq chapitres. Dans le premier nous détaillons les méthodes utilisées ainsi que la préparation du matériel de travail. Le deuxième chapitre comprend les résultats des analyses électrophorétiques et immunoélectrophorétiques du sérum de Rat et il est divisé en trois parties ; dans la première, les protéines du sérum ont été caractérisées après A.I.E. dans un tampon véronal de pH 8,2 et force ionique 0,025 ; dans la deuxième partie, les protéines du sérum ont été caractérisées par des propriétés chimiques ou enzymatiques particulières, après électrophorèse ou A.I.E., toujours en tampon véronal pH 8,2 et force ionique 0,025 ; dans la troisième partie, l'électrophorèse du sérum est réalisée dans des tampons à des pH et des forces ioniques différentes. Dans le troisième chapitre, nous décrivons le fractionnement des protéines du sérum sur colonnes de cellulose et par précipitation à l'aide de l'acétate cuivrique, ainsi que l'analyse des fractions obtenues. Dans le quatrième chapitre, nous donnons les résultats de l'étude individuelle, et éventuellement, la séparation de certaines protéines, à savoir les γ-globulines, la sidérophiline, l'haptoglobine, les α_1-globulines et l'albumine.

La discussion générale des résultats fait l'objet du cinquième chapitre à la fin duquel les principales conclusions tirées de notre travail sont résumées.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATERIEL

1 - LES SERUMS DE RATS -

Nous avons utilisé des rats Wistar. Les animaux ont été saignés par décapitation ; le sang a été centrifugé pour séparer les globules rouges et les stromas et le sérum a été gardé congelé après avoir ajouté du mercurthiolate de sodium à une concentration finale de 1 : 10.000 ; les sérums ainsi préparés sont presque toujours hémolysés ; des sérums non hémolysés ont été préparés de la façon suivante : les rats ont été saignés par ponction cardiaque et le sang a été recueilli dans des tubes qui ont été au préalable paraffinés le long d'un côté, après quoi ces tubes ont été gardés en glacière et placés de façon à ce que le sang soit en contact avec le côté paraffiné ; après 10 à 15 heures de séjour en glacière, le sérum est prélevé par pipettage sans centrifugation.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons utilisé des pools d'une dizaine de rats de sexe indifférent. Ces rats n'ont été soumis à aucun régime alimentaire spécial. Quant à l'âge, nous avons utilisé des rats d'âge moyen (environ 200 grs de poids).

2 - LES HEMOLYSATS DES GLOBULES ROUGES -

Les globules rouges ont été préparés à partir du sang citraté. Après élimination du sérum par centrifugation, ces globules rouges ont été lavés avec du ClNa 0,15 N, dans le but de solubiliser et éliminer les protéines plasmatiques qui les contaminent. Pour les laver, les globules rouges sont suspendus dans 10 fois leur volume de ClNa 0,15 N ; après quelques minutes de contact, la solution de ClNa est éliminée par centrifugation. Cette opération de lavage est répétée 10 fois consécutives puis les érythrocytes sont lysés par dialyse contre de l'eau distillée et les stromas sont éliminés par centrifugation.

3 - LES IMMUNSERUMS -

a) Sérums de lapin anti-sérum de rat.

Nous avons immunisé avec le sérum de rat normal (S.R.N.) 4 séries de lapins (4 lapins dans chaque série) avec des méthodes différentes : dans

la première série, le S.R.N., dilué de 4 fois son volume est injecté aux lapins par voie intramusculaire d'après le protocole suivant : 1ère semaine : 0,2 ml le 1er jour - 0,3 ml le 2ème jour. 2ème semaine : 0,4 ml le 1er jour - 0,5 ml le 2ème jour. 3ème semaine : 0,6 ml le 1er jour - 0,7 ml le 2ème jour. 4ème semaine 0,8 ml. Trois jours plus tard, les lapins ont été saignés (saignée d'essai) ; 3 injections de rappel de 0,2, 0,2 et 0,25 ml de sérum dilué ont été effectuées. Puis les lapins ont été saignés à blanc. Ce sérum a été appelé immunsérum n° 1.

Les lapins de la 2ème série ont été immunisés par injection d'une solution préparée avec 10 ml de ClNa 0,15 N + 5 ml de S. R. N. + 5 ml d'une fraction du sérum renfermant des β et γ-globulines et qui a été obtenue par précipitation du sérum avec du sulfate d'ammonium à 1/3 de saturation. Les taux d'injection ont été : la première semaine 0,2 ml le 1er jour - 0,3 ml le 2ème jour ; la 2ème semaine 0,4 ml le 1er jour - 1,5 ml le 2ème jour ; la troisième semaine 0,6 ml le 1er jour - 0,7 ml le 2ème jour. 5 jours après la dernière injection, les lapins ont été saignés à titre d'essai et ensuite saignés à blanc. Le sérum obtenu constitue le immunsérum n° 2.

Les lapins de la 3ème série ont été immunisés d'abord avec le S.R.N. + adjuvant de Freund, puis avec le S.R.N. dilué 4 fois avec le ClNa 0,15 N. Le mélange de Freund est effectué comme suit : 3 ml de S.R.N. + 3 ml de ClNa 0,15 N + 4,8 ml d'huile de paraffine épaisse + 1,2 ml d'Aquaphor fondu + traces de BK tués.

Des injections intra-musculaires ont été administrées comme suit : la 1er semaine 0,5 ml du mélange de Freund le 1er jour - 0,5 ml du mélange de Freund le 2ème jour. La 2ème semaine 1,0 ml du mélange de Freund le 1er jour - 1,0 du mélange de Freund le 2ème jour. La 3ème semaine 0,5 ml du S.R.N. dilué le 1er jour - 0,5 ml du S.R.N. dilué le 2ème jour. La 5ème semaine : 1,0 ml du S.R.N. dilué le 1er jour - 1,0 ml du S.R.N. dilué le 2ème. La 6ème semaine 1,5 ml du S.R.N. dilué. Au bout de 5 jours, saignée à blanc et l'on a obtenu ainsi l'immunisérum n° 3.

Les lapins de la 4ème série ont été immunisés par injection avec du S.R.N. dilué de 4 fois et administré par voie intra-musculaire aux taux de : la 1ère semaine 0,5 ml le 1er jour - 0,5 ml le 2ème jour - 0,5 ml le 3ème jour. 2ème semaine 1,0 ml le 1er jour - 1,0 ml le 2ème jour 1,0 ml le 3ème jour. 3ème semaine 1,5 ml le 1er jour - 1,5 ml le 2ème jour - 1,5 ml le 3ème jour. Après 2 mois de repos, on a répété exactement le même protocole d'immunisation. A la fin de la 6ème semaine d'immunisation, les lapins ont été saignés à blanc et le sérum obtenu constitue l'immunsérum n° 4.

b) Sérum de poule anti-sérum de rat normal.

Une série de 4 poules ont été immunisées par des injections intraveineuses avec le S.R.N. dilué 4 fois et aux taux de 0,5 ml deux fois par semaine pendant 4 semaines. A la fin de la 4ème semaine les poules sont saignées à blanc.

c) Serums de lapin anti-globules rouges de rat.

Les hémolysats des globules rouges ont été dilués de 4 fois leur volume avec du ClNa 0,15 N et administrés aux lapins par voie intra-veineuse

aux taux de 4 injections par semaine de 0,5 ml chacune la première semaine et de 1 ml chacune la 2ème semaine. Après 5 jours de repos, on a fait une saignée d'essai. Les sérums ne contenaient pas d'anticorps. Les lapins ont été laissés au repos pendant 6 mois puis immunisés pendant 3 semaines comme suit : 1er semaine, 0,5 ml le 1er jour - 0,5 ml le 2ème jour - 0,5 ml le 3ème jour - 0,5 ml le 4ème jour. 2ème semaine 1,0 ml le 1er jour - 1,0 ml le 2ème jour - 1,0 ml le 3ème jour. 3ème semaine 1,5 ml le 1er jour - 1,5 ml le 2ème jour - 1,5 ml le 3ème jour - 1,5 ml le 4ème jour. Après 5 jour, les lapins ont été saignés à blanc.

II - METHODES -

1 - ELECTROPHORESE SUR GEL DE GELOSE (E.G.) ET ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE -

Les techniques d'E.G. et d'A.I.E. (16) ont été employées dans les conditions suivantes : gel de gélose (Difco) à 1 % dans un tampon véronal de force ionique 0,025 et de pH 8,2. Electrophorèse sous 5 volts/cm ; plaques de 4,5 × 10,5 cm avec un temps d'électrophorèse de 1 h 30 ; ou bien des plaques de 13 × 18 cm avec une durée d'électrophorèse de 4 à 5 heures.

Pour les plaques d'E.G., le sérum a été dilué de 2/3 (2 parts de sérum, 2 parts de ClNa 0,15 N) et pour l'A.I.E., il a été dilué de moitié avec un gel à 2 % dans l'eau, juste avant l'électrophorèse.

Pour l'A.I.E., dans les plaques de 4,5 × 10,5 cm, nous avons fait des réservoirs ronds de 0,5 cm de diamètre avec une distance du bord du réservoir à la rigole des anticorps de 0,7 cm ; le contenu des rigoles étant de 0,8 ml d'antisérum, et pour les plaques de 13 × 18 cm les diamètres des réservoirs étaient de 0,8 cm. La distance aux rigoles de 1 cm et le contenu de celles-ci de 1,5 ml. L'épaisseur du gel dans les plaques était dans tous les cas de 0,4 cm.

Les immunsérums n° 1 et 2 ont été, avant emploi, concentrés de 2 à 4 fois leur volume par l'un des procédés suivants : pervaporation, absorption de l'eau par le produit "Aquax" (Gurr & Cie, London) ou par lyophilisation. Les antisérums n° 3 et 4 ont été employés sans traitement préalable.

Les plaques d'E.G. ont été desséchées puis colorées avec le noir Amide d'après la technique d'Uriel et Scheidegger (49).

Les lignes de précipitation de l'A.I.E. ont été colorées aussi par ce même colorant après lavage prolongé des plaques (pendant 5 à 7 jours) à après dessication de celles-ci. Mais, en général, les lignes de précipitation se coloraient mal, c'est pourquoi nous avons pris des photographies des lignes non colorées mais visibles par transparence ; ceci après lavage et avant séchage des plaques.

La microméthode d'A.I.E. décrite par Scheidegger (42) a été également utilisée. Cette méthode utilise des lames porte-objets de 26 × 70 mm avec 2 à 3 mm d'épaisseur du gel et des réservoirs de 1,2 mm de diamètre.

2 - DELIMITATION DES ZONES D'ELECTROPHORESE ET CALCUL DES POURCENTAGES PROTEIQUES -

La transparence du gel de gélose se prête bien à l'enregistrement photométrique, ce qui constitue un procédé simple et commode pour l'évaluation des protéines après séparation électrophorétique. Les deux conditions de validité de la méthode : 1/ proportionnalité entre la concentration de chaque protéine et intensité de la coloration et 2/ capacité de fixation analogue pour chacune des protéines du sérum vis à vis du même colorant, s'accomplissent lorsque la coloration est faite avec le noir amide.

Bien que les protéines du sérum se succèdent presque sans solution de continuité, il y a dans certains endroits accumulation des protéines, ce qui donne des "pics" dans la courbe d'enregistrement correspondants aux différentes zones électrophorétiques, ce qui permet leur évaluation (44).

3 - CALCUL DES MOBILITES PROTEIQUES -

Grabar, Uriel et Courcon (18) ont calculé les mobilités électrophorétiques en gel de gélose des protéines du sérum humain lors de l'électrophorèse réalisée en tampon véronal 0,025 M et pH 8,2. Suivant le même critère, nous avons calculé les mobilités des protéines du sérum de Rat dans ces mêmes conditions d'électrophorèse.

Nous avons fait migrer dans le même plaque un échantillon de sérum-albumine humaine (mobilité moyenne égale à 6 (18), le S.R.N. et le levane (qui sert à calculer le point de mobilité zéro) (6). Après enregistrement photométrique de la bande d'électrophorèse du S.R.N., nous avons tracé des perpendiculaires à la ligne de base, à partir de différents endroits de la courbe d'enregistrement ; par exemple, à partir des points correspondants à la fin d'une zone électrophorétique et le début de la suivante, pour le calcul des mobilités extrêmes de chaque zône ; ou à partir des points du maximum de densité optique pour le calcul des mobilités moyennes.

La sérumalbumine humaine (S.A.H.) et le levane sont également enregistrés et leurs courbes superposées à la courbe du S.R.N. On obtient, dans ces conditions, le point de mobilité six et le point de mobilité zéro. Le calcul est réalisé d'après la formule suivante :

$$\frac{U_x}{U_{(S.A.H.)}} = \frac{D_x}{D_{(S.A.H.)}} \quad ; \quad U_x = \frac{D_x}{D_{(S.A.H.)}} \; U_{S.A.H.} \quad ; \text{ ou}$$

U_x = mobilité cherchée

U_{SAH} = mobilité de la S.A.H. (6.10^{-5} cm^2 volt^{-1} sec^{-1} dans nos conditions d'expérience)

D_x = distance en centimètres parcourue par la protéine x

$D_{(S.A.H.)}$ = distance en centimètres parcourue par la S.A.H.

Pour calculer ces valeurs de mobilité absolue, il est nécessaire de se placer exactement dans les mêmes conditions dans lesquelles la valeur 6 pour la S.A.H. a été calculée. Ceci n'étant pas toujours aisé, nous nous sommes servis dans la plupart des cas des mobilités relatives (18), aussi significatives

que les valeurs absolues et beaucoup plus faciles à calculer. Comme protéine de référence, nous avons pris l'albumine du sérum de Rat.

Après électrophorèse du S.R.N., la distance en centimètres parcourue par l'albumine (comptée à partir du levane) est prise comme unité. Le calcul se réduit à rapporter la distance parcourue par chaque protéine à celle de la S.A.R. (sérum albumine de Rat). Donc mobilité relative :

$$\frac{D_x}{D_{S.A.R.}}$$

4 - CARACTERISATION DES PROTEINES PAR DES COLORATIONS SPECIALES -

Diverses protéines du sérum humain ont été mises en évidence par des réactions de caractérisation spéciales, basées sur l'emploi de colorations spécifiques. Parmi ces colorations, nous avons utilisé les suivantes pour caractériser les protéines du sérum de Rat :

- Caractérisation des protéines par le Soudan noir selon la technique décrite par Uriel (45) ;

- Caractérisation des glycoprotéines par la réaction de l'acide périodique-formazan d'après la méthode d'Uriel et Grabar (46) ;

- Caractérisation des protéines ayant une activité estérasique par l'emploi de l'acétate de β-naphtyle comme substrat et coloration par le diazo bleu d'après Uriel et,

- Caractérisation de cholinestérases suivant une technique analogue mise au point par ce même auteur (47).

- Caractérisation de la céruloplasmine par ses propriétés oxydasiques.

La céruloplasmine réagit avec la p-phenylnediamine et l'oxyde en un produit brun foncé, très stable appelé base de Brandowsky. Uriel a mis au point une technique de caractérisation de la céruloplasmine du sérum humain qui est basée sur cette réaction (48). Cette technique d'Uriel que nous avons légèrement modifiée (voir troisième chapitre), nous a permis de caractériser la céruloplasmine du sérum de Rat.

- La caractérisation de l'hémoglobine a été réalisée par la réaction avec la benzidine. La technique utilisée est celle décrite par Hirschfeld (24).

L'haptoglobine a été caractérisée grâce à la propriété que possède cette protéine de former un complexe avec l'hémoglobine, ce qui permet de la caractériser à l'aide des réactifs de cette protéine ; mais cette caractérisation a nécessité une mise au point spéciale pour le cas du sérum de Rat dont les particularités seront décrites dans l'étude de l'haptoglobine (chapitre 4).

5 - METHODES IMMUNOCHIMIQUES PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES PROTEINES -

- Outre la méthode d'analyse immunoélectrophorétique, nous avons employé les méthodes immunochimiques suivantes :

a) Méthode d'Ouchterlony (34). Cette méthode permet de comparer deux antigènes en les laissant diffuser vers le même antisérum. Si les deux substances sont antigéniquement différentes, leurs lignes de précipitation se croisent ; si elles sont identiques au point de vue antigénique, leurs lignes fusionnent en une seule ligne.

b) Méthode dite des gouttières interrompues (21). Cette méthode est utilisée pour comparer deux antigènes par l'immunoélectrophorèse. Les deux mélanges contenant l'antigène à comparer sont soumis à l'électrophorèse dans la même plaque et l'un à côté de l'autre. On trace ensuite trois gouttières pour les anticorps : deux latérales qui sont continues et une centrale qui présente une interruption à l'endroit où se trouve l'antigène que l'on veut comparer dans les deux mélanges. Les antigènes provenant de chacun de ces deux mélanges se rencontrent, comme dans la méthode d'Ouchterlony.

6 - DETERMINATION QUANTITATIVE DES PROTEINES

Outre la mesure colorimétrique des protéines après électrophorèse, déjà décrite, nous avons déterminé la quantité de protéines par mesure de l'adsorption à 280 mμ. D'autres déterminations ont été effectuées par dosage de l'azote par la micro-méthode de Kjeldahl et, également, par mesure à 555 mμ de la coloration donnée par la réaction du biuret. La courbe étalon a été établie à partir de la sérumalbumine humaine, dans le cas du dosage des protéines d'un mélange. Deux modalités de la réaction du biuret ont été utilisées celle décrite par Gornall (20) et celle décrite par Kabat (26).

Dans le cas de préparations des protéines pures, une courbe étalon a été établie par dosage de l'azote, après quoi les protéines ont été dosées au biuret.

7 - FRACTIONNEMENT DU SERUM PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES DE CELLULOSE -

La chromatographie sur cellulose échangeuse d'ions a été réalisée dans les conditions décrites par Sober et Peterson (41) ; deux types de cellulose ont été employées : le dérivé diethylaminoethyl (D. E. A. E.) échangeuse d'anions et le carboxymethyl (CM) cellulose échangeuse de cations. Aussi bien avec l'une que l'autre des celluloses, les conditions de travail ont été les suivantes :

6 grammes de cellulose sont activés avec NaOH N, lavés jusqu'à élimination de la soude, et équilibrés avec le premier éluant à employer. La cellulose est ensuite placée dans une colonne de 40 cm de longueur et de 2 cm de diamètre, entourée d'un manchon de verre pour permettre le refroidissement. 5 ml de sérum sont dialysés environ 24 heures contre le premier éluant à employer avant d'être placés dans la colonne. Les éluats sont recueillis dans un collecteur automatique de fractions par des fractions de 10 ml ;

le contenu en protéines de ces éluats est évalué par mesure dans un spectrophotomètre de l'absorption à 280 mμ.

Les protéines sont éluées de la colonne par les systèmes de gradient continu et gradient discontinu détaillés ci-dessous :

a) Gradient continu sur D.E.A.E.-cellulose :

Le gradient est fait de 150 ml de tampon phosphate ($PO_4K_2H - PO_4KH_2$), pH 7 et 0,01 M et 150 ml du même tampon mais de pH 5,5 et 0,15 M.

b) Gradient continu sur CM-cellulose :

150 ml de tampon phosphate (PO_4K_2H - PO_4KH_2), pH 5,5 et 0,01 M et 150 ml du même tampon mais de pH 7 et 0,01 M, additionné de ClNa 0,5 M.

c) Système discontinu sur D.E.A.E.-cellulose :

a) système de force ionique croissante et pH décroissant, formé d'une série de 4 tampons phosphate ($PO_4HK_2 - PO_4H_2K$) 0,01 M, pH 7 ; 0,05 M pH 6,5 ; 0,1 M pH 6,3 et 0,15 M pH 6,0.

b) force ionique croissante et pH constant fait d'une série de 4 tampons de mêmes molarités que dans le système précédent mais dont le pH est maintenu constant et égal à 7.

e) Système discontinu sur CM-cellulose :

Il est constitué d'une série de 4 tampons phosphate ($PO_4HK_2 - PO_4H_2K$) 0,01 M, pH 5 ; 0,05 M pH 6 ; 0,1 M pH 6,5 ; 0,5 M, pH 7.

L'élution dans les systèmes discontinus est continuée jusqu'à ce que la D.O. à 280 mμ est nulle ou proche de zéro.

8 - ELECTROPHORESE ET ANALYSE-IMMUNOELECTROPHORETIQUE DANS LES TAMPONS VERONAL ET CARBONATE pH 9,2 -

Nous avons réalisé l'E.G. et l'A.I.E. dans d'autres tampons que le véronal pH 8,2 0,050 M. La manière de procéder est en général la même mais lorsque le pH est de l'ordre de 9,2 et la molarité de 0,1 il est nécessaire de prendre quelques précautions. Nous donnons ci-dessous la description de ces opérations :

a) l'E.G. et l'A.I.E. dans le tampon véronal ClH pH 9,2 0,10 M. Le tampon véronal 0,1 M pH 9,2 (22,2 gr de véronal/litre + 6 ml ClH 1 M) est mélangé juste avant emploi avec un gel de gélose à 2 % dans l'eau. Les bacs d'électrophorèse sont remplis de ce même tampon dilué de moitié ; au cours de l'électrophorèse, il convient de changer de temps en temps les électrodes de place puisque la polarisation est considérable.

Après électrophorèse, les protéines dans les plaques d'E.G. sont fixées à l'acide acétique à 3 % et les plaques d'A.I.E. sont lavées pendant quelques minutes, soit au ClNa 0,15 M, soit au tampon véronal pH 8,2 0,05 M, avant de placer les antisérums dans les rigoles.

b) L'électrophorèse en tampon CO_3Na_2 est faite de la même façon mais la polarisation des électrodes est moins importante. Par contre, les plaques se chauffent davantage et il est nécessaire d'arrêter l'électrophorèse pendant quelques minutes ou de travailler à une température de 4° C, si l'échauffe-

ment est très important. On peut aussi, si l'évaporation est considérable, retirer les plaques des bacs d'électrophorèse et les plonger pendant quelques minutes dans le tampon afin d'imbiber à nouveau le gel. Après électrophorèse, les plaques sont lavées rapidement à l'eau, pour éliminer le carbonate qui se dégage sous forme de CO_2, si les plaques sont fixées à l'acide acétique. Pour les laver, on plonge les plaques dans une cuvette photographique contenant du ClNa 0,15 M et munie d'un système d'agitation. Au bout de 15 minutes de lavage, le carbonate est éliminé des plaques. Celles-ci sont ensuite fixées à l'acide acétique à 2 %. Quant aux plaques d'A.I.E. elles sont soumises au même lavage que le cas du tampon véronal pH 9,2. En effet, les lignes de précipitation antigène-anticorps se forment mal en milieu alcalin.

9 - OBTENTION DES α_1-GLOBULINES ET DE L'ALBUMINE PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE -

L'électrophorèse préparative est réalisée dans le tampon CO_3Na_2 - CO_3H Na dans les mêmes conditions que l'électrophorèse analytique mais avec des plaques de 24 cm de largeur, 18 cm de longueur et un gel de 1 cm d'épaisseur.

Le S.R.N. est dilué de moitié et préalablement dialysé contre le tampon d'électrophorèse. Au moment de l'électrophorèse, on le mélange de moitié avec la gélose à 2 % dans l'eau. Des expériences préliminaires nous ont montré que le front de migration n'est pas parfaitement parallèle au réservoir de départ mais qu'au contraire, il forme un arc du fait que la migration est plus rapide au centre du réservoir qu'au bord ; ceci rend le découpage en bandes difficile après l'électrophorèse.

Pour minimiser cet inconvéniant, au lieu de faire un seul réservoir, nous en avons réalisé 4 de 5 cm de chacun avec 0,5 cm de séparation entre chaque et 1,25 cm entre le bord de la plaque et les réservoirs extrêmes. Chaque réservoir à 1 cm de largeur, ce qui fait un contenu de 1 ml chacun. On peut donc couler 5 ml de sérum au total. On fait migrer en même temps un échantillon de sérum dans une plaque de 18 cm de longueur avec un réservoir de 1 cm^3. Cette plaque-témoin, sert, à la fin de l'expérience, à localiser l'emplacement de l'albumine et des α_1-globulines.

A la fin de l'expérience, la plaque témoin est lavée à l'eau distillée aussi rapidement que possible et plongée dans de l'acide acétique à 2 %. Au bout de quelques minutes, on peut voir l'emplacement de l'albumine et des α_1-globulines. Il suffit donc de découper le gel à ces emplacements en tranches de la largeur adéquate. Après congélation et décongelation des tranches de gélose, les solutions de protéines sont récupérées par filtration sur filtre de verre. Les solutions protéiques ont été ensuite dialysées contre le ClNa 0,15 M.

10 - FRACTIONNEMENT DU SERUM DE RAT PAR L'ACETATE CUIVRIQUE -

Le cation cuivrique a la propriété de précipiter toutes les protéines sériques, même à de très faibles concentrations en Cu^{++}(de l'ordre de 5×10^{-4} M).

Ces complexes cuivre-protéine sont facilement dissociés par l'E.D.T.A.

(sel sodique de l'acide éthylénediamine tétraacétique). Les protéines précipitées sont facilement remises en solution et leurs propriétés ne sont pas altérées (50).

Dans certaines conditions de force ionique et de pH du milieu, la précipitation devient spécifique d'un groupe de protéines et qui est composé notamment des γ-globulines (9). La façon d'opérer est la suivante : 5 ml de sérum sont dilués à 20 ml avec le tampon de Michaelis (30) 0,05 M, pH 6,7 auquel on ajoute du NO_3Na à une molarité finale de 0,4 ; ce tampon est préparé de la façon suivante : 9,714 grs de $CH_3COONa\ 3H_2O$ + 14,714 grs de diethyl-malonylurée sodée sont dissous dans un litre d'eau distillée, libérée de CO_2. A 250 ml de cette solution, on ajoute 15 ml de ClH 1N et 34 grs de NO_3Na puis on complète à 1 litre avec l'eau distillée.

Le sérum qui a été dilué avec ce tampon est dialysé pendant quelques heures en chambre froide contre ce même tampon. On prépare ensuite une solution d'acétate cuivrique 5×10^{-4} M, dans le même tampon, contre laquelle on dialyse le sérum pendant 24 heures en chambre à 18 C. Le précipité qui se forme est séparé par centrifugation puis lavé deux fois avec la solution d'acétate cuivrique qui a servi à la dialyse ; le précipité est ensuite dissous dans quelques gouttes de solution 10^{-1} d'E.D.T.A. Après dissolution, il est amené à un volume de 10 ml avec le ClNa 0,15 M après quoi, il est dialysé à froid pendant 2 ou 3 jours contre une solution de ClNa 0,15 M afin d'éliminer le cuivre et l'E.D.T.A. Ce précipité redissout est appelé fraction B.

On ajoute quelques gouttes d'E.D.T.A. au surnageant de la précipitation par l'acétate cuivrique et on le dialyse contre du ClNa 0,15. Pour bien éliminer le cuivre, il est nécessaire de continuer la dialyse pendant 3 jours. Ce surnageant est appelé fraction A.

DEUXIÈME CHAPITRE

RÉSULTATS DE L'ÉLECTROPHORÈSE ET DE L'ANALYSE IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM DE RAT NORMAL

1 - ELECTROPHORESE ET ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE EN TAMPON VERONAL 0,05 M pH 8,2 - NOMENCLATURE DES PROTEINES -

Le sérum de Rat se comporte, à l'électrophorèse en gel, à pH 8,2 d'une façon caractéristique. En effet, si on le compare avec les sérums d'autres mammifères (13), l'albumine migre bien plus lentement dans le cas du sérum de Rat.

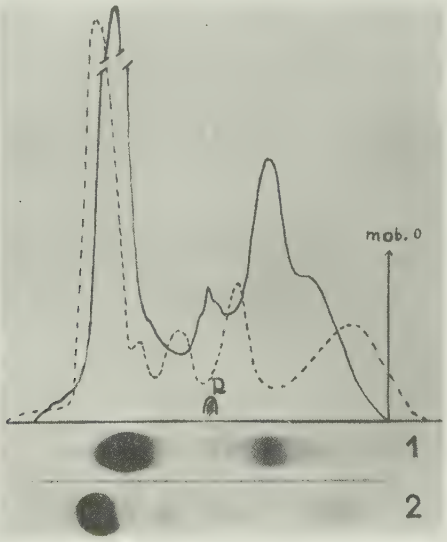


Figure 1 - Photographies de l'électrophorèse d'un sérum de Rat (1) avec courbes densitométrique (a ligne continue) et d'un sérum humain (2) et courbe densitométrique (en pointillée).

En outre, si l'on compare le sérum de Rat avec le sérum humain, figure 1 on voit qu'il ne contient pas de γ-globulines lentes, ce qui fait que la mobilité moyenne de ces protéines est plus élevées pour le sérum de Rat.

La délimination des zones électrophorétiques a été effectuée de façon à pouvoir conserver la nomenclature donnée par Grabar et Courcon (13). Nous avons distingué ainsi les 6 zones suivantes :

1ère zone : protéine rho ; 2ème zone albumine + α_1-globulines ; 3ème zone : α_2-globulines ; 4ème zone β_1-globuline : 5ème zone : β_2-globulines ; 6ème zone : γ-globulines.

Ces zones ne correspondent pas toujours à des maxima dans la courbe d'enregistrement photométrique ; c'est notamment le cas des α_2-globulines et des β_1-globulines. Cependant l'A.I.E. montre l'existence de protéines dont les mobilités se situent dans ces zônes.

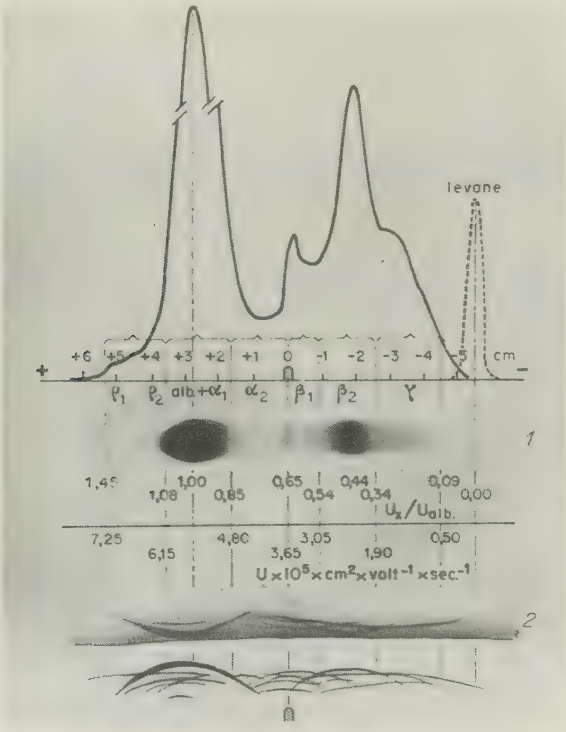


Figure 2 - 1/ Electrophorèse du sérum de Rat, avec enregistrement, division en zones, distance en centimètres, mobilités absolues et relatives.
2/ A.I.E., photographie et schéma.

Le calcul des pourcentages protéiques après coloration au Noir amide et l'enregistrement photométrique nous a donné les résultats suivants : 1ère zone : 5 % ; 2ème : 51 % ; 3ème : 7 % ; 4ème : 6 % ; 5ème : 20 % ; 6ème : 11 %. Dans la figure 2, nous avons rassemblé une électrophorèse en gélose (durée 4 heures ; 5 volts/cm) avec enregistrement photométrique et délimitation en zones ; distance en cm à partir d'un échantillon de lévane, les valeurs des mobilités absolues ($U \times 10^{+5}$ cm^2 volt^{-1} sec^{-1}) et mobilités relatives par rapport à l'emplacement de l'albumine dans le diagramme total $\frac{U_x}{U_{SAR}}$. En bas, une photographie d'une analyse immunoélectrophorétique effectuée en même temps et un schéma des principales lignes de précipitation. Ces valeurs des mobilités correspondent au début et à la fin de chaque zone et sont rassemblées dans le tableau 1.

Tableau 1

Zones	Mobilités extrêmes des "zones" électrophorétiques du S. R. N.	
	$U \times 10^5$ cm^2 volt^{-1} sec^{-1}	$\frac{U_x}{U_{alb.}}$
ρ_1 et ρ_2	7,25 - 6,15	1,45 - 1,10
alb. + α_1	6,15 - 4,80	1,10 - 0,85
α_2	4,80 - 3,65	0,85 - 0,65
β_1	3,65 - 3,05	0,65 - 0,55
β_2	3,05 - 1,90	0,55 - 0,35
γ	1,90 - 0,50	0,35 - 0,09

L'analyse immunoélectrophorétique (A. I. E.) montre la complexité des groupes électrophorétiques. Avant d'exposer les détails sur les constituants individuels décelés dans chacune des zones d'E. G. , précisons que les résultats d'A. I. E. étaient différents selon les immunsérums utilisés, quant à la quantité de constituants mis en évidence et à la netteté des lignes de précipitation obtenues. Ainsi, les sérums de poule ne permettaient le développement que d'environ 4 ou 5 constituants.

Les antisérums n° 1 et 2 avaient une faible teneur en anticorps notamment le n° 1 ne développait pas plus de 10 constituants ; de plus, les lignes de précipitation étaient très faibles. Nous avons eu de meilleurs résultats avec ces sérums concentrés de 2 à 4 fois.

Par contre, les antisérums n° 3 et 4, très riches en anticorps, nous ont permis de déceler 21 constituants. De plus, la teneur en anticorps de ces antisérums était suffisante pour les utiliser sans concentration et les lignes de précipitation se coloraient facilement.

Néanmoins, certains constituants n'apparaissaient pas avec ces deux derniers sérums (sérums de lapins hyperimmunisés). Nous reviendrons plus bas sur les particularités de chaque immunsérum au fur et à mesure de la description détaillée des protéines. Nous rapportons ici le nombre total de constituants décelés avec tous les antisérums utilisés et ceci d'après nos observations, sur un nombre assez élevé d'immunoélectrophorèses. Ces constituants, au nombre de vingt et un, sont répartis dans les zones électrophorétiques de la façon suivante figure 3.

1/ Dans la zone rho, deux constituants ont été décelés. Nous les avons appelée rho_1 et rho_2, les chiffres 1 et 2 exprimant l'ordre de mobilité (rho_1 étant la plus rapide). Bien que quantitativement non négligeables, les protéines de cette zone se décèlent mal à l'immunoélectrophorèse, ce qui indiquerait qu'elles ne sont pas très antigéniques. C'est ainsi qu'elles sont décelées avec les deux premiers antiserums seulement après qu'ils aient été concentrés. Le 3ème antisérum développait seulement la rho_1 et le 4ème sérum ne contenait des anticorps ni envers la rho_1, ni envers la rho_2.

2/ Dans la zone albumine + α_1 : 6 proteines ont été dénombrées. La première ligne qui apparaît toujours avec tous les antisérums employés est

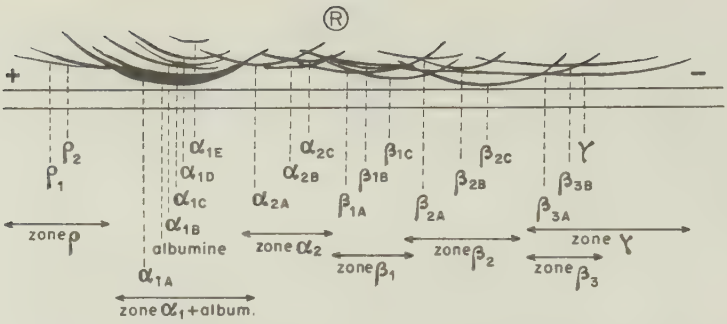


Figure 3 - Schéma des lignes de précipitation de l'analyse immunoélectrophorétique de sérum de Rat avec délimitation des zones et nomenclature des protéines.

la sérumalbumine. Comme l'ont décrit Grabar et Courcon, il est caractéristique de cette protéine de migrer bien plus lentement que les albumines des autres mammifères ; de ce fait, la vitesse de migration serait comparable à celle des α_1-globulines des sérums d'autres animaux. Ceci fait que les constituants α_1 sont inclus dans le pic de la sérumalbumine. L'arc de précipitation de l'albumine est net, incurvé et a été décelé avec tous les immunsérums.

Cinq α_1-globulines ont été décelées ; 4 d'entre elles ont la particularité de donner des arcs de précipitation parallèles qui ont presque la même mobilité. Elles ont été appelées α_{1A}, α_{1B}, α_{1C}, α_{1D}, la cinquième étant l'α_{1E}. Les lettres A, B, C, D, E,font allusion uniquement aux mobilités (décroissantes de A à E). L'arc de l'α_{1A} est très fin et se confond avec celui de l'albumine lorsque les plaques ne sont pas suffisamment développées. Les α_{1B} et α_{1D} donnent des arcs très nets, visibles avec tous les antisérums employés, même avec les antisérums de poule (lequel contenait la plus faible quantité d'anticorps). Il s'agit donc de deux protéines très importantes quantitativement et très antigéniques.

L'arc de l'α_{1C} n'apparaît pas toujours et dans tous les cas, il est très faible et croise les arcs des α_{1B} et α_{1D}.

L'α_{1E} donne un trait de précipitation droit et très éloigné de la gouttière des anticorps. Bien que nous l'avons classée dans la zone α_1, sa mobilité est intermédiaire entre α_1 et α_2.

Protéines de la zone α_2 : trois protéines ont été dénombrées dans cette région : α_{2A}, α_{2B}, α_{2C}. La plus importante est l'α_{2A} . Sa ligne de precipitation se place entre l'albumine et le réservoir des protéines. Elle apparaît avec tous les antisérums de lapins que nous avons essayés.

Les deux autres α_{2B} et α_{2C} sont des constituants mineurs non décelables autrement qu'avec les antisérums n° 3 et 4. L'α_{1C} se distingue de l'α_{1B} par son arc de précipitation très large, bien que peu important quantitativement.

La zone des β_1 : Cette zone est peu importante du point de vue quantitatif. Trois protéines ont été décelées : β_{1A}, β_{1B}, β_{1C}. Seule la β_{1C} est facilement décelable mais si la gouttière des anticorps n'est pas suffisamment éloignée du réservoir de départ, la courbure de sa ligne de précipitation peut se confondre avec la rigole des anticorps.

La zone des β_2 : Les trois protéines β_{2A}, β_{2B}, β_{2C}, décelables dans cette zone ont les particularités suivantes : la β_2A donne un trait de précipitation aplati qui peut au cours du développement des plaques, rejoindre une autre ligne de la zone γ et former ainsi un trait de précipitation très long et peu incurvé et placé juste au-dessus de la ligne des γ ; dans certains sérums vieillis ou très hémolysés, cette ligne se déforme et présente deux courbures. La β_{2C} est quantitativement la plus importante de la zone β_2 et également une des plus abondantes du sérum. Sa ligne de précipitation est l'une des premières à apparaître avec l'albumine, les α_{1B}, α_{1D} et les γ-globulines. Au cours du développement des plaques, la ligne disparaît avec les antisérums n° 1 et 2, ce qui est sans doute dû à un excès d'antigène. Avec les antisérums n° 3 et 4, elle se conserve bien. Cette ligne est très large et très incurvée.

La zone γ : Dans la zone γ, on trouve dans le sérum de Rat comme dans les sérums de souris (4,22), à côté de la ligne principale des γ-globulines, une autre ligne parallèle mais beaucoup plus faible et plus courte ; elle peut rejoindre la β_{2A} comme nous l'avons dit. De ce fait, on serait amené à dire que le sérum de rat contient deux γ-globulines. Cependant, et comme pour le sérum humain, nous avons réservé le nom de γ-globulines à la seule ligne qui s'étale depuis les zones de mobilité relative 0,09 à la zone des α_2-globulines. Pour désigner les autres lignes, nous avons délimité une autre zone que nous avons appelée β_3, comme cela a été fait dans le sérum de souris (22). Elle comprendrait deux protéines, une β_{3B}, dont nous avons parlé plus haut, et une β_{3A} dont on voit la terminaison de l'arc de précipitation mais sa courbure se confond avec la ligne des γ-globulines.

2 - CARACTERISATION DES PROTEINES PAR DES COLORATIONS SPECIALES APRES ELECTROPHORESE ET ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE -

La coloration des glycoproteines dans les plaques d'E.G. montre que ce type de protéines existe dans toutes les zones électrophorétiques ; la coloration est la plus forte dans la zone albumine. Sur les plaques d'immuno-électrophorèse, aucune ligne n'est colorée par la réaction de glucides ; ceci est sans doute dû au fait que la quantité des groupements aldéhyde dans le complexe antigène-anticorps n'est pas suffisante pour dépasser la limite de sensibilité de la réaction.

La coloration des lipoprotéines révèle quatre zones dans les plaques d'E.G. : deux dans la zone rho et deux dans la zone alb. + α_1. La coloration des lignes d'A.I.E. est très faible ; seules la rho$_1$ et l'α_{1E} ont été caractérisées comme étant des lipoprotéines.

Trois zones d'activité estérasique ont été révélées par l'acétate de β-naphtyle ; ces zones correspondent aux rho, alb. + α_1 et α_2 ; par l'acétate de thiocholine, les mêmes zones ont été caractérisées comme ayant une activité cholineestérase mais ici, seule la partie lente des rho-protéines apparaît active alors qu'avec le β-naphtyl-acétate, toute la zone rho est colorée (23).

A l'A.I.E., trois lignes ont une activité estérasique vis à vis de l'acétate de β-naphtyle. Ce sont la rho-$_1$lipoprotéine, α_1E-lipoprotéine et l'α_{1C}. La plus forte activité est due à l'α_{1C} (ligne qui croise les deux $\alpha_1$protéines les plus importantes α_{1B} et α_{1D}). Signalons néanmoins qu'il est nécessaire de dis-

poser d'un antisérum riche en anticorps pour déceler les activités estérasiques à l'A.I.E. C'est ainsi qu'elles ont pu être mises en évidence seulement avec l'antisérum n° 4 ou avec les autres antisérums concentrés et que, de toute façon, la rho_1 et la α_{1E} sont plus difficiles à déceler que l'α_{1C}.

En outre, il faut un lavage prolongé des plaques afin de bien éliminer l'immunsérum, car l'activité due à celui-ci pourrait fausser les résultats.

La figure n° 4 montre la caractérisation des protéines par diverses techniques, après l'électrophorèse et l'analyse immunoélectrophorétique.

3 - L'ELECTROPHORESE ET L'A.I.E. DANS D'AUTRES TAMPONS -

Nous venons de voir que les α_1-globulines et l'albumine du sérum de Rat ont la même mobilité en gélose lorsque l'électrophorèse est réalisée dans un tampon véronal pH 8,2 et que de ce fait le diagramme électrophorétique ne comporte que six zones ou groupes de protéines au lieu des sept observés dans les sérums d'autres mammifères.

Nous avons observé que si le pH et la force ionique du tampon d'électrophorèse sont augmentés, la zone électrophorétique albumine + α_1 se dédouble en deux parties dont la plus rapide correspond à l'albumine et la plus lente renferme les α_1-globulines (10). Par ailleurs, la position relative des autres protéines n'étant pas modifiée, nous avons dans ces conditions une meilleure séparation électrophorétique des protéines du sérum de Rat, qui est comparable à celle du sérum humain à pH 8,2.

Nous avions observé ce phénomène de dédoublement pour un pH de l'ordre de 9, mais les pH trop alcalins ne conviennent pas aux protéines du sérum. Nous avons donc étudié la migration des protéines du sérum de Rat, à des pH allant de 8,2 à 9,2 dans le but de délimiter le pH le moins alcalin qui conviendrait à une résolution de la zone albumine + α_1. De plus, nous avons toujours fait en parallèle les électrophorèses du sérum de Rat et du sérum humain, pour voir si ce changement dans la mobilité électrophorétique (en l'occurence diminution de celle des α_1-globulines comme nous verrons plus tard), était propre au sérum de Rat, ou par contre s'il s'agissait d'un phénomène plus général.

Pour cette étude, nous nous sommes servis des tampons suivants : véronal sodique avec des quantités variables de ClH pour obtenir des valeurs de pH allant de 8,2 à 9,2 ; borate sodique-acide chlorhydrique pour des valeurs de pH de l'ordre de 9 ou supérieures ; carbonate sodique-bicarbonate sodique pour des pH de même ordre de grandeur ; nous avons employé aussi parfois le tampon de Micaelis à la place du tampon véronal-chlorhydrique.

Les résultats de l'électrophorèse avec le tampon véronal à des pH différents peuvent être résumés comme suit :

- A des pH inférieurs à 8,3, l'albumine et les α_1-globulines migrent ensemble quelle que soit la molarité du tampon.

- Leurs mobilités sont toujours identiques à des pH supérieurs à 8,3, lorsque le véronal est 0,025 M dans le gel.

- Par contre si l'on augmente à la fois le pH et la molarité, la mobilité des α_1 est différente de celle de l'albumine ; c'est ainsi qu'à une molarité de 0,05 dans le gel et à pH 9,2, ces deux protéines migrent l'une à côté de l'autre leurs zones électrophorétiques étant parfaitement séparées.

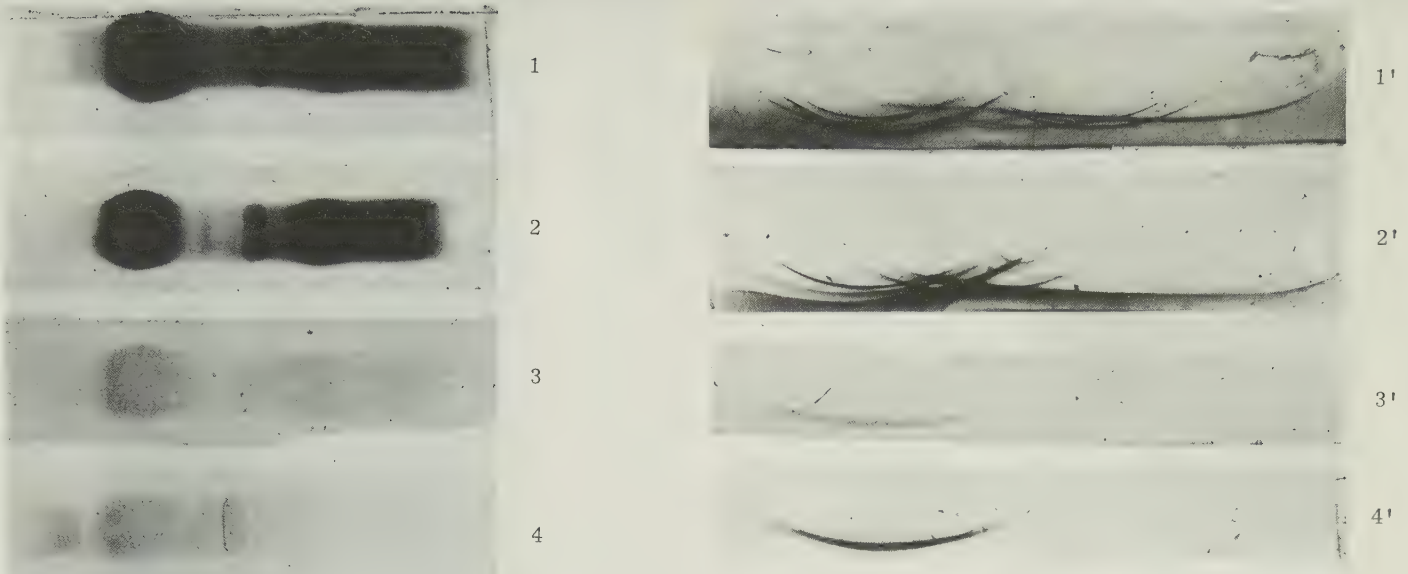


Figure 4 - Différentes caractérisations des protéines du S.R.N. après simple électrophorèse, à gauche, et après l'A.I.E., à droite : 1/ coloration au Noir Amide ; 2/ id à l'Azocarmin ; 3/ id des glycoprotéines ; 4/ id des lipoprotéines ; 5/ id des estérases ; 6/ id des cholinoestérases ; 1'/ A.I.E., avec antisérum n° 4, coloration noir amide ; 2'/ A.I.E. avec antisérum n° 2, coloration azocarmin ; 3' et 4', coloration esterases antisérum n° 2 et 4 respectivement.

Nous avons conservé la force ionique de 0,05 et nous avons fait varier progressivement le pH du tampon à partir de la valeur 8,2 jusqu'à celle de 9,2, dans le but de déterminer le pH le plus bas auquel se produit ce dédoublement de la zone électrophorétique de l'albumine. Dans le tableau n° 2 sont indiquées les quantités de ClH qu'il est nécessaire d'ajouter à une quantité fixe de véronal sodique pour obtenir le pH désiré.

Tableau 2

Tampon véronal sodique - acide chlorhydrique

Peser 94 gr de diethyl malonyl urée sodique ;
Dissoudre dans 4,2 l d'eau distillée ;
Prendre 500 ml de cette solution + x ml de ClHN

x	pH
17	8,2
12	8,4
10	8,6
6	8,8
4,2	9,0
3	9,2

Ce pH le plus bas est de l'ordre de 8,6 mais l'enregistrement photométrique ne permet pas d'apprécier deux pics bien différenciés à ce pH. La séparation de la zone alb + α_1 augmente progressivement avec le pH du tampon, mais il faut arriver à pH 9 pour que les deux pics soient bien nets.

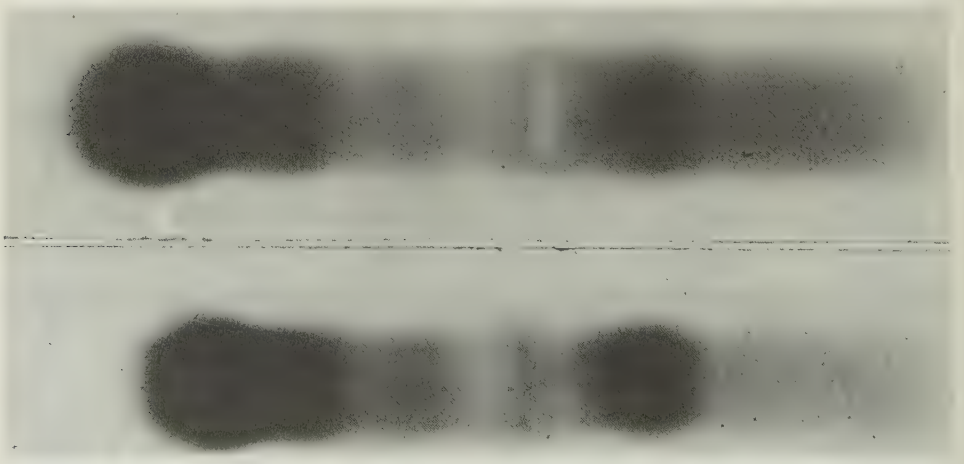


Figure 5 - Photographies des E.G. du S.R.N. en tampon véronal 0,05 M, pH 8,8 (1) et 0,05 M pH 8,4 (2).

La figure 5 montre en haut une électrophorèse en gélose de 5 heures sous 5 volt/cm, du sérum de Rat dans un tampon véronal de molarité 0,05 et pH 8,8. En bas, une électrophorèse de 4 heures sous 5 volt/cm avec le tampon véronal molarité 0,05 et pH 8,4. Avec le tampon de Michaelis nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec le véronal.

Le tampon borate permet d'obtenir des pH de l'ordre de 9, mieux que le véronal ; de plus il a déjà été employé en électrophorèse sur gélose avec de bons résultats. Le gel se forme bien et les lignes de précipitation à l'A.I.E. sont très nettes. Or, les résultats avec ce tampon ne s'accordent pas avec ceux du tampon véronal. En effet, l'électrophorèse du SRN dans un tampon borate à pH 9 ou même 9,2, de molarité 0,05 donne la même image électrophorétique que le tampon véronal pH 8,2 et 0,025 molaire ; c'est-à-dire que la mobilité des protéines n'est nullement affectée, malgré l'augmentation du pH du tampon et de la conductivité. Nous n'avons pas eu de modification non plus lorsque nous avons encore doublé la molarité du borate. Il ne s'agit pas d'un effet particulier du tampon sur la mobilité mais plutôt d'une combinaison du borate avec la gélose, ce qui modifie et le pH et la molarité du tampon initial ; aussi nous avons mesuré la conductivité du tampon et son pH avant d'être mélangé à la gélose, et dans le gal après destruction de celui-ci par congélation. Dans le cas du borate, la conductivité qui est de l'ordre de 7×10^{-3} avant, devient $1,4 \times 10^{-3}$ après, c'est-à-dire qu'elle diminue de 5 fois, et que le pH passe de 9,1 à 8,6. Les autres tampons ne semblent pas être affectés par le fait de les mélanger à la gélose.

Dans le tableau n° 3, nous donnons les pH et la conductivité des différents tampons avant et après être mélangés au gel.

Tableau 3

Tampon	Conductivité $\frac{\text{moh}}{\text{cm}}$		pH	
	Avant	Après	Avant	Après
Véronal pH 8,2 0,025 M	4×10^{-3}	$2,2 \times 10^{-3}$	8,2	8,2
" " 8,2 0,050 M	$7,5 \times 10^{-3}$	4×10^{-3}	8,2	8,2
" " 9,0 0,050 M	$7,5 \times 10^{-3}$	4×10^{-3}	9,0	8,9
Borate " 9,1 0,050 M	$7,2 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	9,1	8,6
Carbonate 9,2 0,050 M	$7,4 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-3}$	9,1	9,3

Pour obtenir des pH de l'ordre de 9, nous avons aussi utilisé un tampon $CO_3Na_2 - CO_3H\,Na$.

Avec un pH 9 ou 9,2 et une molarité en $CO_3^=$ égale à 0,05, la séparation du groupe alb + α_1 est très nette comme le montre la figure 6, où nous avons placé l'un à côté de l'autre les électrophorèses dans les tampons véronal 0,025 M pH 8,2 et carbonate 0,05 M pH 9,2, et leurs enregistrements photométriques.

Mais aussi l'allure générale du diagramme semble être modifiée. Le calcul des mobilités relatives nous a montré que ce sont les α_1-globulines qui sont ralenties dans leur migration, ou que du moins la mobilité de ces protéines ne varie pas dans le meme sens que celle des autres protéines.

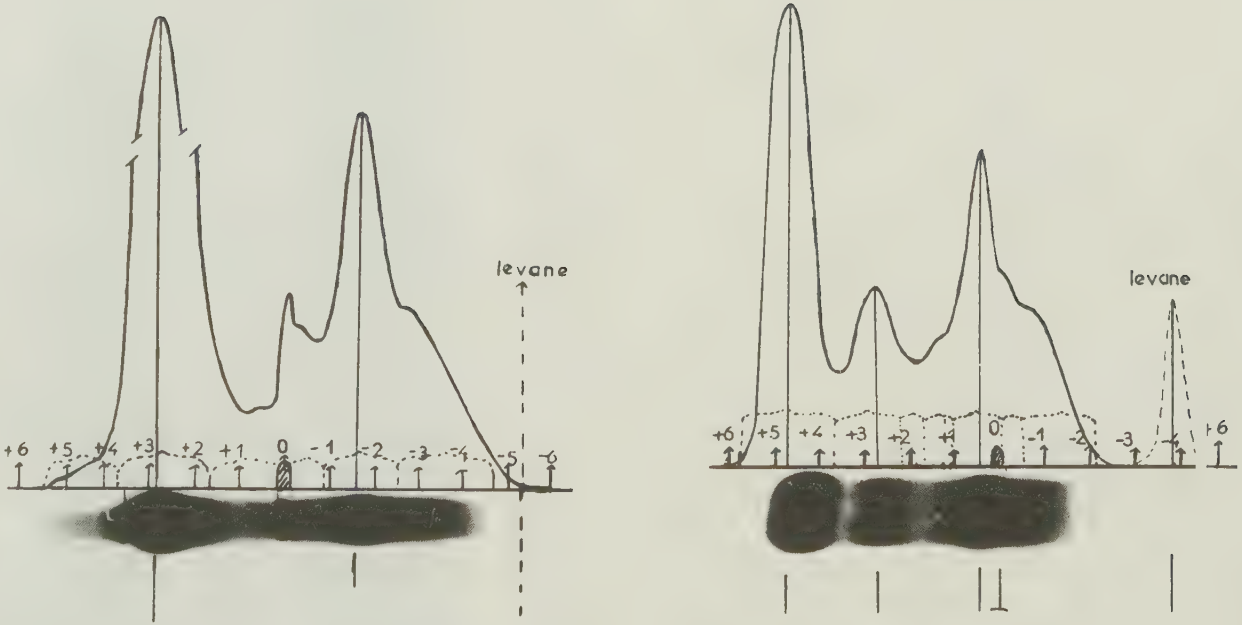


Figure 6 - Photographie des E.G. du S.R.N. en tampon véronal 0,025 M, pH 8,2 (à gauche) et carbonate 0,050 M pH 9,2 (à droite), avec courbes d'enregistrement et distances en cms.

En effet, si l'on prend la distance entre l'albumine et les autres protéines, on voit qu'elle est constante pour les différents tampons véronal, alors que la distance à la zone des α_1-globulines diminue progressivement avec l'augmentation du pH. Nous avons pris comme protéines de référence pour mesurer cette distance, les β_2-globulines qui donnent un pic bien net à l'enregistrement optique, et aussi le pic des gamma globulines. Dans le tableau n° 4, nous donnons les mobilités relatives moyennes $\frac{U_x}{U_{SAR}}$ des protéines α_1, β_2 et γ. On voit que seule la mobilité du groupe α_1 est modifiée. Dans le tampon $CO_3^=$ la mobilité de toutes les protéines est altérée. L'A.I.E. réalisée dans ce tampon montre aussi une altération dans la position relative des lignes de précipitation des protéines par rapport à celle de l'albumine. Mais ce tampon nous a donné de bons résultats pour préparer les α_1-globulines et l'albumine par électrophorèse préparative.

Les conclusions qui peuvent être tirées de cette étude sont qu'il suffit d'augmenter légèrement le pH du tampon véronal et de doubler sa molarité pour obtenir une meilleure résolution du sérum de Rat, un pH de 8,8 et même 8,6 donnant déjà de bons résultats qui permettent par simple électrophorèse de différencier l'albumine des α_1-globulines. Un tampon plus alcalin, et en l'occurence le tampon carbonate 0,05 M pH 9,2 donne de bons résultats pour séparer l'une ou l'autre des protéines par électrophorèse préparative (voir chapitre 4).

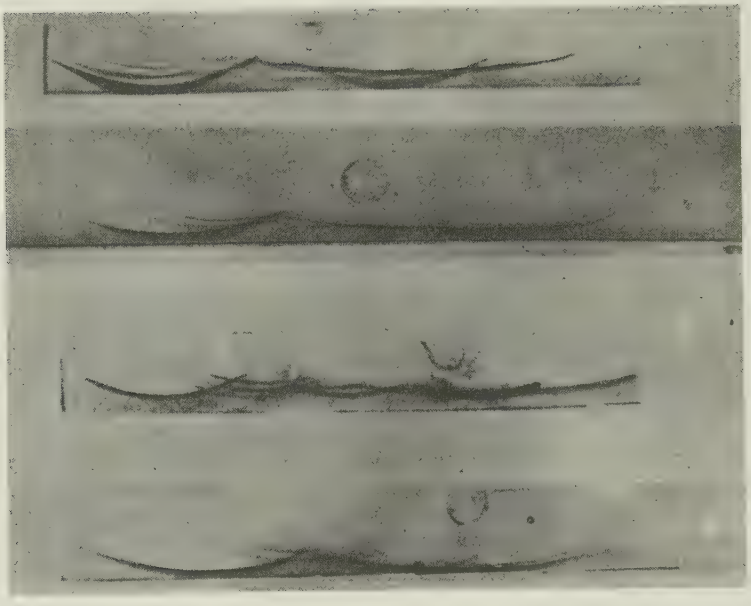
Tableau 4

Tampon	Mobilités relatives $\frac{{}^{T}J_x}{U_{S.A.R.}}$		
	α_1-glob	β_2-glob	γ-glob. mob. moyenne
Véronal pH 8,2 0,025 M	1	0,42	0,29
" " 8,2 0,050 M	1	0,42	0,29
" " 8,8 0,050 M	0,86	0,42	0,29
" " 9,0 0,050 M	0,84	0,42	0,25
Borate " 9,1 0,050 M	1	0,42	0,29
Carbonate " 9,2 0,050 M	0,75	0,50	0,37

L'A.I.E. montre que cette variation dans la mobilité affecte toutes les protéines du groupe α_1. En effet, la première zone électrophorétique donne une seule ligne de précipitation, alors que la deuxième zone contient les cinq α_1-globulines, qui par ailleurs conservent la même position relative qu'elles avaient en tampon véronal 0,025 M pH 8,2.

Dans la figure n° 7 sont représentées les photographies des A.I.E. dans différents tampons ainsi que les schémas correspondants.

Cette variation dans la mobilité des α_1-globulines semble être une particularité du sérum de Rat. Nous avons observé en effet, que dans le cas du sérum humain, le changement du tampon d'électrophorèse n'influence pas la migration d'une protéine ou groupe de protéines en particulier, mais lorsqu'il y a variation, cela affecte toutes les protéines. Ainsi l'augmentation du pH produit un déplacement des protéines vers le pôle positif qui est le même pour chacune des zones électrophorétiques.



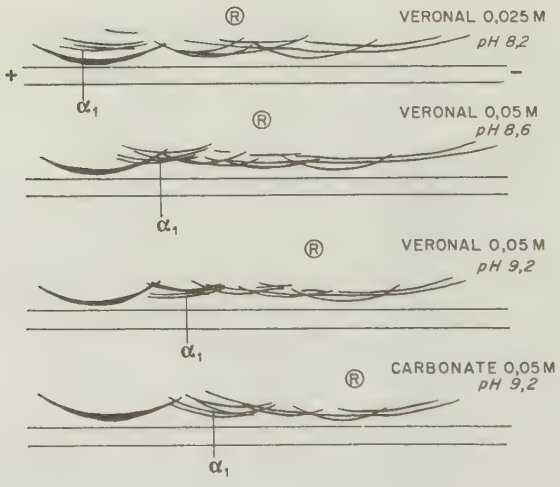


Figure 7 - En haut : Photographies des A.I.E. du S.R.N. réalisées respectivement et de haut en bas, dans les tampons : véronal 0,025 M (dans le gel) pH 8,2 ; véronal 0,05 M pH 8,6 ; véronal 0,05 M pH 9,2 et carbonate 0,05 M pH 9,2.
En bas : Schemas de ces analyses.

TROISIÈME CHAPITRE

RÉSULTATS DU FRACTIONNEMENT DU SÉRUM DE RAT

1 - FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE D.E.A.E. CHELLULOSE

Lorsque 5 ml de sérum de Rat sont placés sur une colonne de D.E.A.E. cellulose et élués avec un gradient continu de pH 7 à 5,5 et molarité en phosphate 0,005 à 0,2, on obtient une distribution des protéines dans les éluats qui est indiquée dans la figure 8.

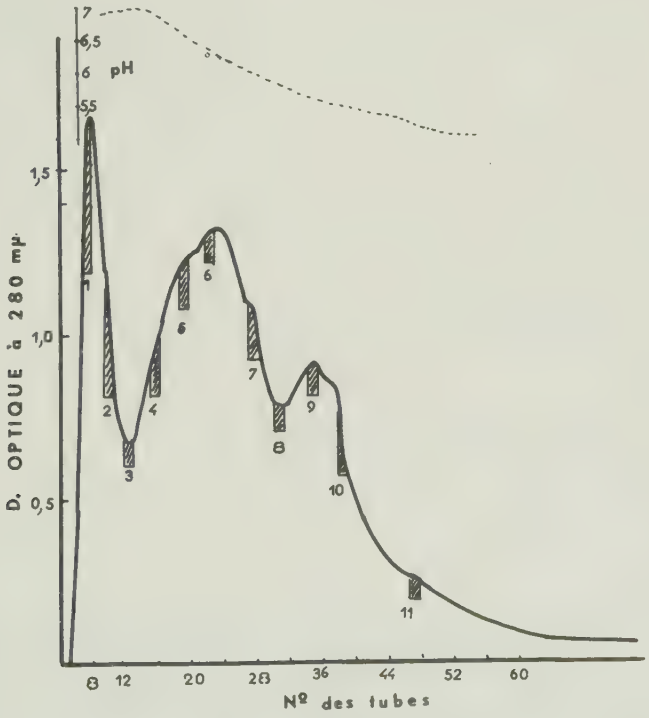


Figure 8 - Chromatographie de 5 ml de S.R.N. sur D.E.A.E. cellulose. Elution : gradient continu.

Cette figure représente en abscisse les n° des éluats de 10 ml de volume, en ordonnées la mesure de l'absorption à 280 mμ de ces éluats. On voit que les protéines commencent à passer dans le tube 5 et que la D.O. des tubes suivants augmente rapidement jusqu'à 1,7 et décroît aussitôt. Ensuite, les protéines s'étalent sur tous les éluats sans qu'à aucun moment la concentration dans les éluats ne retombe vers zéro, mais la courbe présente encore deux maxima.

Le pH et la conductivité ont été contrôlés dans chaque éluat pour suivre le gradient. Des fractions ont été prélevées par rassemblage de plusieurs éluats consécutifs, en plusieurs endroits de la courbe qui sont indiqués par les chiffres 1, 2, 3 etc. Les fractions ont été concentrées par le produit Aquax ou par pervaporation, jusqu'à une concentration approximative de 3 mg/ml ; puis dialysées contre le ClNa 0,15 M et ensuite analysées par l'A.I.E.

Les résultats de l'A.I.E. ne sont pas représentés puisque comparables à ceux du fractionnement avec gradient discontinu exprimés dans la figure 9. Cette analyse montre que les fractions 1, 2, et 3 contiennent des gamma globulines de différente mobilité - celle-ci augmente de la fraction 1 à 3. En plus les fractions 1 et 2 renferment aussi des β_2-globulines et principalement β_{2c} dans la fraction 2. Les β_1 commencent à passer dans la fraction 3 ; mais toutes ces trois fractions sont hétérogènes. C'est ainsi que l'A.I.E. permet de déceler au moins 3 protéines dans chacune de ces trois fractions. Dans la fraction 4 on décèle les mêmes protéines et aussi de l'albumine. Dans la 5, on constate l'existence des β_1, des α_2 et de l'albumine et encore des γ-globulines. Dans la 6, on retrouve des gamma globulines rapides qui correspondent aux fractions migrant près du réservoir ; elle contient aussi des α_2, des β_1 et de l'albumine. La fraction 7 est composée surtout de l'albumine, mais elle contient aussi des α_2 et encore des gamma globulines rapides. La 8 contient encore prépondéramment de l'albumine et aussi des α_2, de plus les α_1 commencent à apparaître. Les 9, 10 et 11 sont composées essentiellement des α_1, mais on retrouve des traces d'albumine et dans toutes les fractions on peut déceler plusieurs protéines.

Ce fractionnement ne nous a donc pas permis d'obtenir des fractions pures, mais trois conclusions peuvent être formulées :

1/ les protéines sérum de Rat sont éluées d'une façon analogue à celles du sérum humain.

2/ les γ-globulines sont particulièrement hétérogènes puisqu'elles ont été retrouvées dans presque tous les éluats.

3/ les α_1-globulines, au moins les deux plus importantes, sont éluées après l'albumine et non pas avant comme c'est le cas du sérum humain.

Nous avons aussi constaté que les premières fractions sont plus pures que les dernières.

L'élution avec un gradient discontinu à pH décroissant et molarité décroissante (4 tampons) donne une courbe avec 4 pics chromatographiques bien nets pour chaque tampon ; celui qui élue la plus grande quantité de protéines est le 2ème tampon (0,05 M pH 6,6), puis le 3ème tampon (0,10 M pH 6,3). Le pic du 1er tampon est comparable au premier de la colonne à gradient continu et le dernier est approximativement du même ordre de grandeur que le premier.

Dans la figure 9, nous avons représenté l'élution avec ce gradient discontinu et l'E.G. et l'A.I.E. des fractions obtenues, lesquelles ont été prélevées à des endroits marqués sur la courbe par les chiffres 1, 2, 3 etc.

Les résultats de l'E.G. après concentration des fractions jusqu'à environ 3 mg/ml indiquent que l'élution se fait essentiellement dans le même sens que dans la colonne éluée avec un gradient continu, c'est-à-dire que les gamma globulines sont éluées d'abord (1er tampon), puis les β_1 et β_2-globulines et encore des gamma globulines plus rapides (2ème tampon) ; le 3ème tampon élue principalement l'albumine et en dernier lieu les α_1-globuline dans le 4ème tampon.

L'A.I.E. montre que le premier tampon élue les fractions plus pures qui correspondent à des γ-globulines lentes, mais qui sont toujours contaminées par les globulines β_2 notamment par la β_{2c} globuline. Nous ne nous arrêterons pas à la description détaillée de l'A.I.E. de chaque fraction puisque, comme nous l'avons déjà dit, l'élution est faite de la même manière que dans le cas du gradient continu. La seule différence est que les fractions prises dans les sommets de la courbe sont plus pures, mais de toutes manières les tampons 2, 3 et 4 éluent des mélanges de protéines toujours assez complexes. On peut tirer les mêmes conclusions que dans l'élution à gradient continu, à savoir que les gamma globulines sont retrouvées un peu partout et que les α_{1B} et α_{1D} sont éluées avec le 4ème tampon, alors que l'albumine l'est avec le 3ème.

Signalons enfin que nous n'avons pas décelé aucune ligne rho dans aucun éluat mais ceci ne voudrait pas dire qu'elles sont retenues dans la colonne puisque ces protéines sont toujours mal décelées à l'A.I.E.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR CM - CELLULOSE ; CARACTERISATION DE LA CERULOPLASMINE -

La carboxymethyl cellulose sépare moins bien les protéines du sérum de Rat que la D.E.A.E. cellulose. Tant avec les systèmes de gradient continu qu'avec le discontinu, nous avons obtenu des fractions renfermant toutes un nombre élevé de protéines. Cependant, ce fractionnement nous a permis de caractériser la céruloplasmine. Cette protéine qui contient du cuivre a été découverte par Hollmerg et Laurent (25) dans le sérum humain. Nous avons essayé sans succès de caractériser cette protéine dans le sérum du Rat en utilisant la technique de caractérisation de la céruloplasmine humaine après l'E.G. et l'A.I.E. ; ceci pourrait faire penser à l'inexistance de cette protéine dans le sérum de Rat, or, la première fraction qui est éluée sur CM-cellulose avec le tampon 0,01 M pH 5,5 est de couleur bleue et contient du cuivre. Nous l'avons mis en évidence par les réactifs de ce métal, dans les éluats de la colonne. Dans ces mêmes éluats, nous avons cherché l'activité oxydasique vis à vis de la p-phenylènediamine. C'est ainsi que nous avons déterminé que le pH optimum d'activité est situé aux environs de 5 à 5,5, alors que le pH d'activité pour la même protéine du sérum humain est de l'ordre de 6,7 (48). Nous avons ainsi pu caractériser cette protéine par la p-phénylènediamine dans les conditions suivantes : tout de suite après électrophorèse dans le cas de l'E.G. et après développement et lavage des plaques dans le cas de l'A.I.E., celles-ci sont plongées dans un tampon acétate 0,1 M pH 4,7 pendant 30 minutes environ, et ensuite dans une solution de p-phénylènediamine qui est faite par dissolution de 22 mg de produit dans

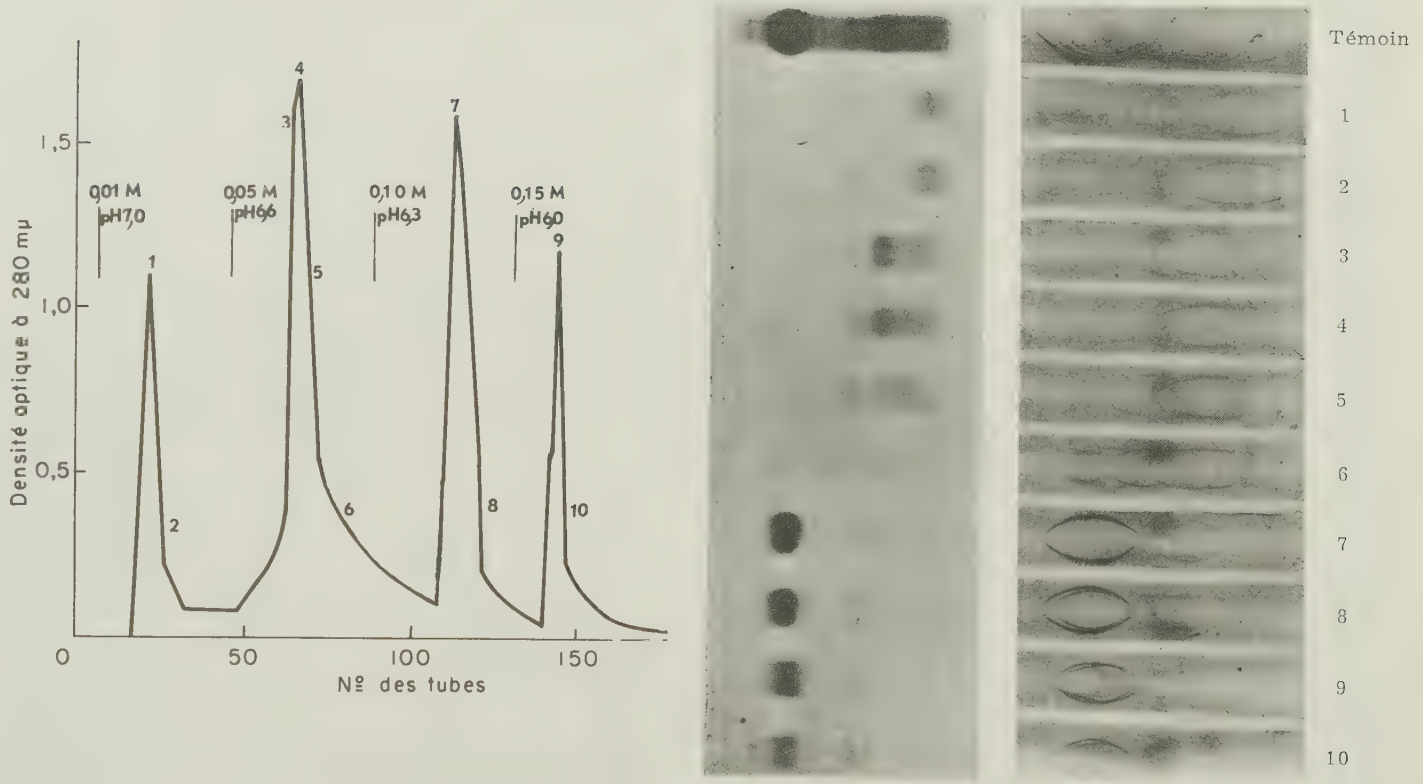


Figure 9 - Chromatographie de 5 ml de S.R.N. sur D.E.A.E. cellulose ; élution : gradient discontinu ; 1, 2, 3 etc fractions analysées par E.G. et l'A.I.E. A droite : photographies de ces analyses ; Témoin : S.R.N.

100 ml de tampon acétate 0,1 M de pH 5,7. Les plaques sont ensuite placées à 37°C jusqu'à l'apparition de la couleur brun foncée propre de la réaction -en principe de 60 à 120 minutes- ensuite lavées dans le tampon à pH 4,7 et séchées. Nous avons déterminé ainsi que cette protéine est placée dans la zone électrophorétique albumine + α_1-globulines. L'électrophorèse effectuée en tampon véronal pH 8,8, 0,05 M montre qu'elle correspond à la zone des α_1-globulines, et l'A.I.E. nous a permis d'identifier l'α_{1A}. Cette ligne étant semblable à la α_{1C} en intensité et aussi par son emplacement et qu'en conséquence il est difficile de décider de laquelle de ces deux lignes il s'agit, nous avons fait une double coloration d'esterases (qui permet d'identifier l'α_{1C}) et de la céruloplasmine, après une A.I.E. réalisée en tampon véronal 0,05 M pH 8,8. Ceci nous a permis de constater qu'il s'agit de deux protéines différentes (figure 10), la céruloplasmine étant l'α_{1A} comme il a été dit.

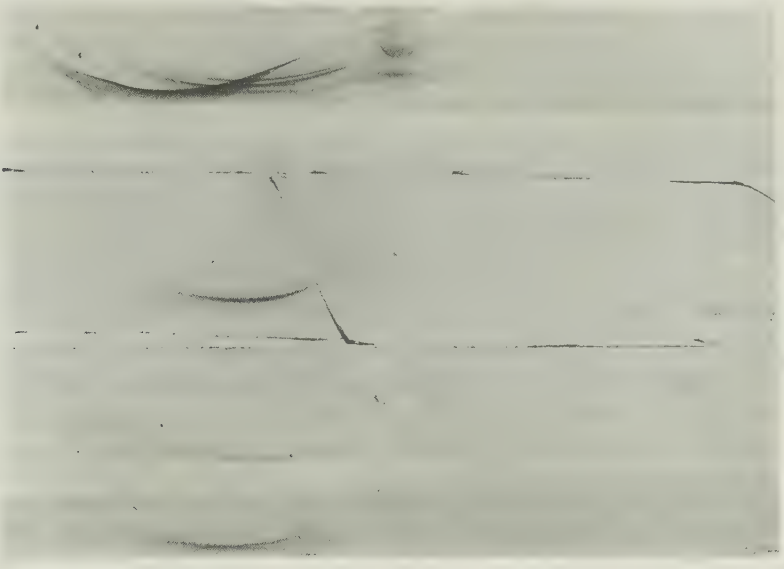


Figure 10 - Analyse immunoélectrophorétique de la fraction du sérum éluée sur CM cellulose à pH 5,5 (1).
2/ Caractérisation de la céruloplasmine α_{1A} dans cette fraction.
3/ Id. de la α_{1C} estérase.
4/ Double coloration de l'α_{1A} et de l'α_{1C}.
Tampon véronal pH 8,6 0,05 M.

- Signalons enfin que le fractionnement sur CM cellulose nous a permis de distinguer deux autres protéines se situant presque à côté du réservoir de départ et qui seraient des globulines β_1 par leur mobilité, comme on peut le voir sur la figure 10.

- D'autre part le fractionnement sur D.E.A.E. cellulose nous a permis de déceler une activité estérasique dans la zone électrophorétique des β_1-globulines, après E.G., dans la fraction éluée avec le 2ème tampon.

3 - FRACTIONNEMENT DU S.R.N. PAR PRECIPITATION PAR L'ACETATE CUIVRIQUE -

Dans une étude antérieure (9) portant sur la précipitation des protéines du sérum humain par la cation Cu^{++}, nous avons montré que l'acétate cuivrique précipite même à des concentrations très faibles en Cu^{++}, tous les constituants protéiques du sérum et que cette précipitation devient sélective d'un groupe restreint de protéines qui est composé notamment des gamma globulines, si l'on respecte certaines conditions de pH et de force ionique du milieu de précipitation.

Ce procédé de précipitation a été effectué sur le sérum de Rat :

Lorsqu'on dialyse le S.R.N. (dilué 4 fois) contre une solution d'acétate cuivrique 5×10^{-4} M dans un tampon de Michaelis 0,05 M de pH 6,7 et qui contient du NO_3Na 0,4 M, il se forme à la température de + 18°C un précipité qui correspond approximativement aux 30 % des protéines totales du sérum, et qui a été appelé fraction B, le surnageant étant la fraction A.

L'électrophorèse de cette fraction B montre qu'elle est formée surtout des gamma globulines, mais on retrouve aussi d'autres protéines migrant dans les zones β_2-globulines, albumine + α_1 et α_2.

L'A.I.E. permet de voir figure 11 que les γ-globulines précipitent dans leur totalité (qualitativement et quantitativement). En effet, toute la ligne des γ-globulines est retrouvée dans la fraction B et aucune trace de ces protéines n'est décelée dans A. Les protéines que nous avons appelées β_3-globulines sont aussi incluses dans ce précipité. Les autres protéines incluses dans le précipité cuivrique sont la ρ_1-lipoprotéine, la β_{2B}-globuline et une protéine de la zone alb + α_1 que nous avons identifiée comme étant l'albumine au moyen de la méthode des gouttières interrompues ; en effet, une immunoélectrophorèse de la fraction B comparée à un sérum de Rat total avec une rigole des anticorps arrêtée juste à l'emplacement de l'albumine dans le sérum total donne une réaction d'identité entre cette protéine et celle de la fraction B.

La réversibilité de la réaction de précipité par le cuivre a été montrée : le S.R.N. est précipité par l'acétate cuivrique dans les conditions décrites. Quelques gouttes d'E.D.T.A. sont ajoutées au sérum ainsi traité pour dissoudre le précipité formé qui n'a pas été séparé. Ensuite le tout est dialysé contre le ClNa 0,15 M. La quantité des protéines mesurées au biuret dans le sérum non traité par le sel cuivrique et dans le sérum précipité et redissout, est la même. Du même que les images électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de ces deux sérums sont identiques.

Toutes les protéines sont donc remises en solution et ni leur mobilité électrophorétique ni leur antigénicité ne sont modifiées par le traitement par le sel cuivrique. Il n'y a donc pas dénaturation des protéines par ce procédé de précipitation qui constitue une méthode simple pour obtenir les γ-globulines lentes et rapides, débarrasées de presque toutes les autres protéines sériques.

Si l'on compare le précipité cuivrique du sérum humain (9) et celui du sérum de Rat, on constate que la précipitation est analogue, bien qu'on observe aussi de légères différences : en premier lieu, la réaction est plus rapide que le sérum humain où il suffit d'une dialyse de 12 heures pour que la précipitation soit complète alors que pour le sérum de Rat il faut prolonger la dialyse pendant plus d'une journée. De plus, dans le sérum humain

nous avons observé un précipité irréversible qui correspond à des α -lipoprotéines, alors que pour le Rat toutes les protéines ont été remises en solution. Il est vrai aussi que dans le sérum de Rat la quantité de α -lipoprotéines existantes est très faible par rapport au sérum humain, ce qui expliquerait ce que nous venons de dire. Autre particularité, dans la fraction B du Rat nous avons trouvé des traces d'albumine tandis que cette protéine n'a pas été décelée dans le précipité B du sérum humain. Nous ne pensons pas qu'il s'agissent d'une précipitation spécifique de cette protéine mais d'un entrainement dans le précipité duquel elle aurait été mal éliminée par défaut de lavage. Pour les autres protéines précipitées, nous ne possédons pas assez de renseignements pour dire s'il s'agit des mêmes protéines que dans le cas du sérum humain.

Signalons cependant que la précipitation de ces deux sérums est analogue en ce qui concerne la séparation de la totalité des γ-globulines et de la rho-lipoprotéine dans le précipité.

Quant à la précipitation des protéines β_3, inexistantes chez l'homme, elle nous semble présenter un certain intérêt puisque ces protéines semblent faire partie du groupe des immunoglobulines ; ce qui a été montré pour la β_{3A} (2).

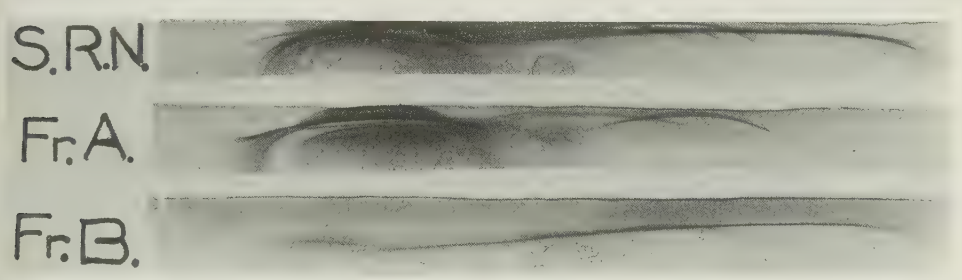


Figure 11 - A.I.E. à pH 8,2 du S.R.N. et des fractions A et B obtenues après précipitation par l'acétate cuivrique.

QUATRIÈME CHAPITRE

ÉTUDE INDIVIDUELLE DE QUELQUES PROTEINES

1 - CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION B DU PRECIPITE CUIVRIQUE SUR D.E.A.E. CELLULOSE ETUDE DES GAMMA GLOBULINES -

Il est bien connu que les gamma globulines sériques constituent une famille de protéines ayant une même antigénicité et des mobilités voisines. Ceci explique que leur ligne de précipitation immunoélectrophorétique soit allongée et étendue sur plusieurs zones de migration (14). Elle s'étend dans le cas du Rat depuis la zone de mobilité la plus lente jusqu'à celle de l'albumine.

Nous avons déjà dit que la chromatographie du S.R.N. total sur D.E.A.E. cellulose permettait de déceler des γ-globulines dans les fractions éluées avec différents tampons. D'autre part, nous venons de voir que la fraction B de précipitation par acétate cuivrique contient toutes les γ-globulines et que les autres protéines les accompagnant sont en moindre quantité. Il nous a paru intéressant donc d'essayer d'obtenir des γ-globulines de différentes mobilités à partir de ce précipité. En conséquence nous avons réalisé la chromatographie de la fraction B sur D.E.A.E. cellulose d'une manière analogue que lors du fractionnement du sérum total. L'élution a été faite avec un gradient discontinu, obtenu avec le tampon phosphate de molarité croissante et de pH décroissant. Aussi un gradient à pH constant et égal à 7, de molarité croissante a été utilisé. Les deux systèmes ayant donné les mêmes résultats, nous nous sommes servis du système à pH constant. 10 ml de fraction B -qui résultent de la précipitation de 5 ml de sérum-, sont dialysés contre un tampon phosphate 0,01 M pH 7 et placés dans une colonne de 28 cm haut × 2 cm diamètre. L'élution est faite au moyen d'un système de 7 tampons tous à pH 7 ; la molarité en phosphate étant 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,10 et 0,50 respectivement. Les éluats ont été recueillis par fractions de 10 ml et mesurés à 280 mμ.

Le premier tampon élue une quantité de protéines assez importante figure 12 et la densité optique des éluats monte assez rapidement pour décroître aussitôt. Le 2ème tampon élue beaucoup moins de protéines, de même que les tampons 0,03 M, 0,04 M et 0,05 M ; la D.O. n'est jamais très élevée et ne décroît pas aussitôt mais lentement ; c'est-à-dire que les protéines éluées sont réparties d'une façon plus uniforme que dans la fraction premièrement éluée. Finalement, les tampons 6 et 7 éluent des fractions à peu près de la même manière que le tampon 1.

Dans la figure 5 nous avons représenté la courbe chromatographique ; les chiffres 1, 2, 3 etc indiquent les fractions prises pour être analysées par

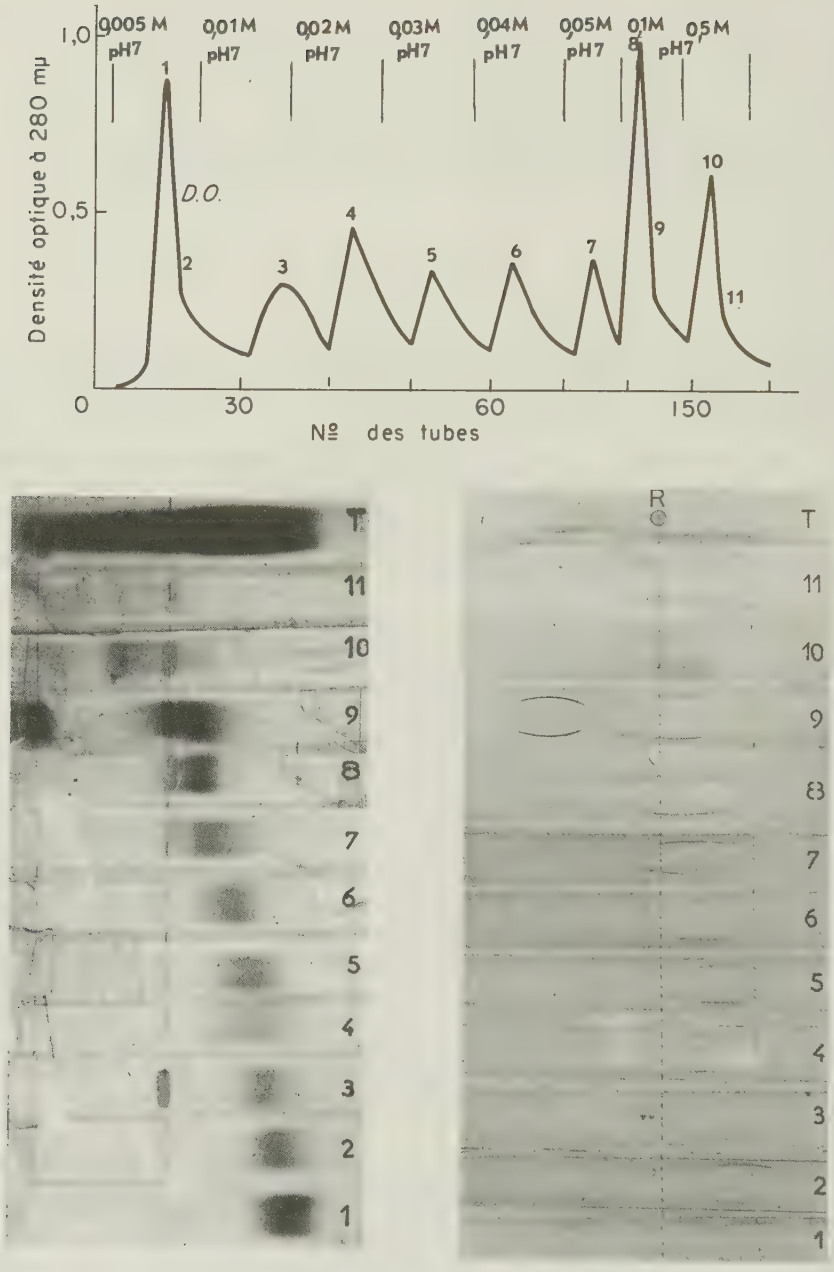


Figure 12 - Chromatographie de fraction B sur D.E.A.E. cellulose ; 1, 2, 3 etc fractions analysées par E.G. et par l'A.I.E. ; à droite : photographies de ces analyses et témoin (T) fraction B.

E.G. et A.I.E. Les résultats de ces analyses se trouvent indiqués dans la même figure. (Ces fractions ont été au préalable amenées à une concentration voisine de 2 mg par ml et dialysées contre du ClNa 0,15 M). L'E.G. de ces fractions montre que les 6 premières sont des γ-globulines dont la mobilité croît de la première à la sixième. Toutes les six semblent être homogènes sauf la 4ème où l'on voit deux zones de migration. Dans les cinq dernières fractions on observe deux ou même trois zones de migration.

L'analyse immunoélectrophorétique montre que les fractions 1, 2, 3, 5 et 6 sont des globulines gamma pures puisqu'une seule ligne de précipitation est décelée dans chacune ; la fraction 4 contient aussi la β_{2B}. La fraction 7 contient déjà 4 constituants, dont l'un deux rappelle le trait aplati des γ-globulines. La 8 et la 9 prélevées toutes deux dans la fraction éluée avec le tampon 0,5 M, contiennent l'albumine, aussi bien dans ces fractions que dans la 10 et la 11 il y a un constituant au trait aplati, typique des γ-globulines.

Donc, après l'A.I.E. il semble que toutes les fractions contiennent des γ-globulines. Pour vérifier s'il s'agit bien de ces globulines, nous avons comparé la fraction 1 avec chacune des autres par la méthode de double diffusion. Dans chaque cas il y a une réaction d'identité totale, ce qui prouve bien que dans toutes les fractions il y a des gamma globulines.

Dans la figure 13 nous avons représenté la réaction d'identité donnée par les fractions 4 et 5, 10 et 11 avec la fraction 1. Nous avons calculé la mobilité relative de ces globulines gamma en prenant les lignes de précipitation de l'A.I.E. En effet, ces protéines étant assez dispersées à l'E.G., il est difficile de mesurer la mobilité.

Dans le cas de l'A.I.E., nous avons pris le maximum de courbure dans le cas où celles-ci sont bien incurvées, ou approximativement le milieu de la ligne lorsqu'elles sont aplaties. Ces valeurs de mobilité sont indiquées dans le tableau n° 5.

Tableau 5

Mobilités des lignes de précipitation (A.I.E.) des γ-globulines séparées par chromatographie sur sur D.E.A.E. cellulose.

Fraction N°	Mobilité relative $\frac{U_x}{U_{S.A.R.}}$
1	0,19
2	0,23
3	0,26
4	0,30
5	0,34
6	0,41
7	0,51
8	0,54
9	0,56
10	0,62
11	0,70

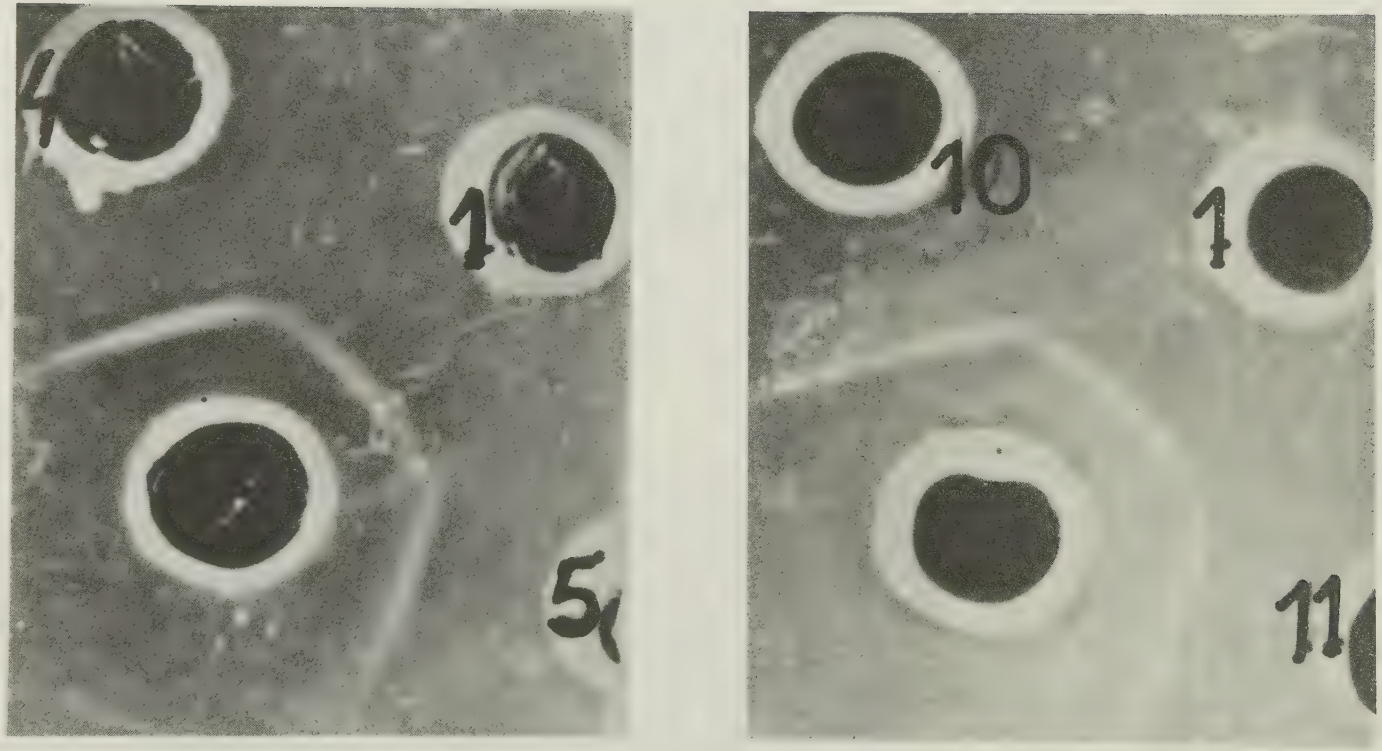


Figure 13 - Double diffusion selon Ouckerlony, de quelques unes des fractions de chromatographie de la fraction B sur D.E.A.E. cellulose.

Une preuve définitive qu'il s'agit bien des γ-globulines dans tous les cas est apportée par l'expérience suivante : la fraction 11 est injectée aux lapins. Au bout de quelques semaines d'immunisation on peut constater que l'immunsérum produit contient des anticorps envers toutes les γ-globulines du sérum de Rat. En effet, si on réalise une A.I.E. d'un sérum de Rat avec cet immunsérum, on constate que toute la ligne γ est développée.

La même expérience de chromatographie réalisée avec la fraction B du sérum humain donne des résultats différents puisque le premier tampon élue déjà la totalité des globulines gamma.

En conclusion :

1/ les γ-globulines du sérum de Rat sont très hétérogènes.

2/ il existe des γ-globulines très rapides de mobilité proche de celle de l'albumine.

3/ les γ-globulines sont faciles à séparer par chromatographie sur D.E.A. cellulose.

4/ si cette séparation chromatographie est réalisée à partir de de la fraction B on peut obtenir pures 5 γ-globulines de mobilité différente.

2 - PREPARATION ET ETUDE DE LA SIDEROPHILINE -

Du groupe β_2, la plus importante est la β_{2c}-globuline.

Nous avons isolé cette protéine par chromatographie de la fraction A (surnageant de la précipitation du S.R.N. par acétate cuivrique) sur D.E.A.E. cellulose : 40 ml de fraction A (surnageant de la précipitation de 10 ml de sérum) sont dialysés contre le tampon adéquat, puis placés sur une colonne de 60 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre, et éluée avec un tampon phosphate monopotassique-phosphate dipotassique pH 7, 0,01 molaire en $PO_4^{\equiv}$; la lecture de l'absorption des éluats à 280 mμ indique que la protéine commence à passer dans le tube 10 ; elle atteint son maximum de concentration dans les tubes 17, 18 et 19 ; son passage peut être considéré terminé dans le tube 30 (les éluats ayant un volume de 10 ml).

Les éluats des tubes 17, 18 et 19 présentent une coloration jaune qui devient rouge saumon après concentration.

Le contrôle de la fraction éluée a été fait par E.G. et A.I.E. dans la fraction du tube 18 et dans le mélange des tubes 17 à 30. Aussi bien dans un cas comme dans l'autre, la fraction est homogène à l'électrophorèse et une seule ligne a été décelée à l'A.I.E. Cette ligne correspond à la β_{2c} globuline figure 14. La couleur rouge saumon de cette protéine rappelle la protéine transporteuse de Fe découverte dans le sérum humain par Schade et Caroline (40) et appelée sidérophiline ou transferrine.

La réaction positive avec les réactifs du fer confirme cette hypothèse.

Nous avons calculé le contenu en fer de la sidérophiline par la méthode de Schade (38) qui consiste essentiellement à placer la protéine dans un milieu légèrement acide (pH 5,5) dans lequel le complexe fer-sidérophiline est dissocié, après quoi le Fe libéré est évalué par spectrophotométrie. Comme colorant du fer nous avons employé l'orthophenantroline ferreux - ClH (qualité Merck) et comme réducteurs du Fe^{+++} l'acide ascorbique et le bisulfite de Na.

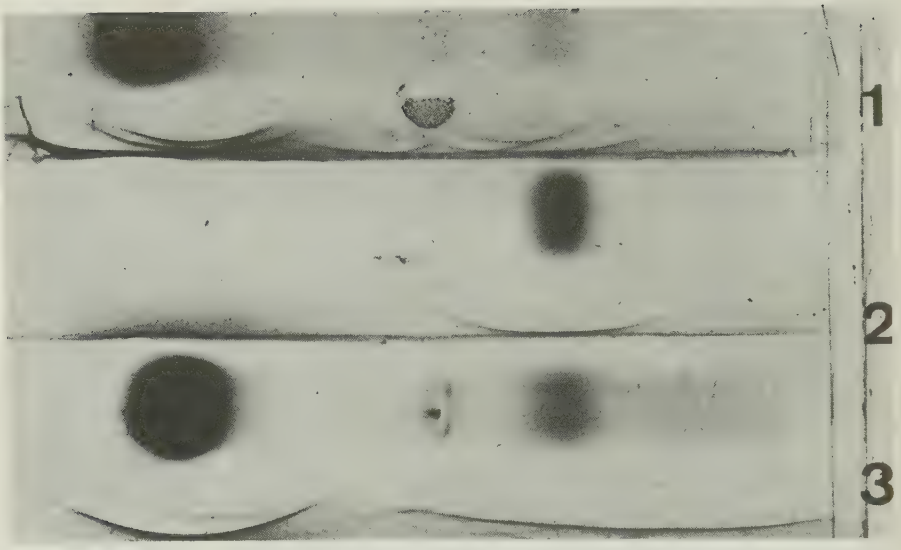


Figure 14 - 1/ E.G. et A.I.E. de la fraction A de précipitation cuivrique.
2/ id. id. d'une préparation de sidérophiline.
3/ id. id. d'un S.R.N.

Le complexe fer-phénantroline est évalué par lecture à 540 mμ. Une courbe étalon a été établie au préalable à partir du sel de Mohr.

La capacité de saturation en Fe a été évaluée par la méthode de Schade et Caroline (40), qui consiste à ajouter une quantité connue de Fe^{++} à la protéine, laquelle est placée dans un tampon à pH 8,2 auquel le complexe Fe-Siderof.n'est pas dissocié. Par mesure spectrophotométrique du fer en excès, on peut calculer par différence avec la quantité de métal ajouté, celui qui a été combiné. De même que pour le calcul du fer contenu dans la transferrine, nous nous sommes servis de l'orthophenantholine ferreux au lieu du bathophenantroline proposé par Schade.

La capacité de saturation a été aussi mesurée par la méthode directe de Schade et coll. (39) dont le principe est : la couleur rouge saumon et donc la D.O. de la sidérophiline augmente progressivement lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de Fe^{++}, jusqu'à ce que la protéine soit saturée après quoi sa D.O. reste stationnaire ou même décroît légèrement du fait de la dilution.

Cette sidérophiline du sérum de Rat présente les caractéristiques suivantes :

- son contenu en fer mesuré par la méthode de Schade est de 1,2 γ de Fe^{++} par mgr de protéine. L'évaluation de la protéine ayant été faite par détermination du contenu en azote et en prenant 7,1 comme facteur de conversion.

La protéine est non saturée en Fe et elle a une capacité d'absorption

de ce métal s'élevant à 3 γ de Fe par mg de protéine (mesure effectuée par la méthode directe de Schade et Caroline, et par la méthode de Schade).

Son spectre d'absorption au visible présente un maximum à γ = 410 mμ.

3 - CARACTERISATION DE L'HAPTOGLOBINE. ETUDE DU COMPLEXE HEMOGLOBINE - HAPTOGLOBINE -

La plus importante des α_2 est l'α_{2A} globuline. Sa ligne à l'A.I.E. apparaît avec tous les antisérums employés, et se caractérise par son trait de précipitation placé entre l'albumine et le réservoir de départ. Nous l'avons identifiée à l'haptoglobine. Cette protéine découverte dans le sérum humain par Poloncwsky et Jayle (36) a la propriété de former un complexe avec l'hémoglobine (Hp - Hb), et de ce fait elle peut être mise en évidence par des réactions peroxidasiques de cette protéine.

Nous avons observé que dans les sérums très hémolysés 2 zones d'activité peroxidasique sont décelées, l'une avec une mobilité des α_2, l'autre avec une mobilité intermédiaire des β_1 et β_2, et que dans les sérums peu hémolysés, seule la α_2 est mise en évidence par les réactions peroxydasiques.

La caractérisation par la benzidine dans les hémolysats de globules rouges montre que la zone d'activité peroxydasique de l'hémoglobine est située dans les $\beta_1 - \beta_2$.

La caractérisation après A.I.E. nous a donné les résultats suivants : dans les sérums hémolysés et avec l'antisérum n° 1, deux lignes de colorent par la benzidine ; l'une est l'α_{2A}, l'autre une ligne presque droite ayant une mobilité β_1 - β_2. Dans les sérums peu hémolysés et toujours avec l'antisérum n° 1, seule l'α_{2A} apparaît colorée par réaction avec la benzidine.

Dans l'A.I.E. des sérums très hémolysés développés par l'antisérum n° 2, seule l'α_{2A} est mise en évidence par les réactions peroxydasiques et le même résultat est obtenu avec un sérum peu hémolysé.

Finalement dans le sérum non hémolysé la caractérisation de l'haptoglobine est réalisée par addition d'un peu d'hémoglobine au sérum juste avant l'électrophorèse dans le but de former le complexe Hb - Hp. Nous avons constaté que si on procède de cette manière et qu'on caractérise après par réaction avec la benzidine, seule l'activité de la zone β est mise en évidence après simple électrophorèse, et qu'après l'A.I.E. avec l'antisérum n° 1 une seule ligne se colore (avec une mobilité de β_1 - β_2) et aucune avec l'antisérum n° 2.

Ces résultats s'expliquent de la façon suivante : la zone β_1 - β_2 correspond à l'activité de l'hémoglobine. En effet, la zone d'activité peroxydasique des hémolysats de globules rouges se trouve à cet endroit comme nous l'avons dit figure 14. La α_{2A} serait la protéine fixant l'hémoglobine, donc l'haptoglobine ; d'autre part, l'antisérum n° 1 contiendrait des anticorps antihémoglobine, ce qui ne serait pas le cas de l'antisérum n° 2. En effet, un sérum de lapin antihémoglobine développe dans l'hémoglobine cette ligne β_1 - β_2 ayant une activité peroxydasique.

Dans la figure 15, nous avons représenté l'A.I.E. d'un sérum très hémolysé et d'un sérum peu hémolysé développé avec l'antisérum n° 1.

Le fait que dans les sérums peu hémolysés seule la ligne α_{2A} soit déce-

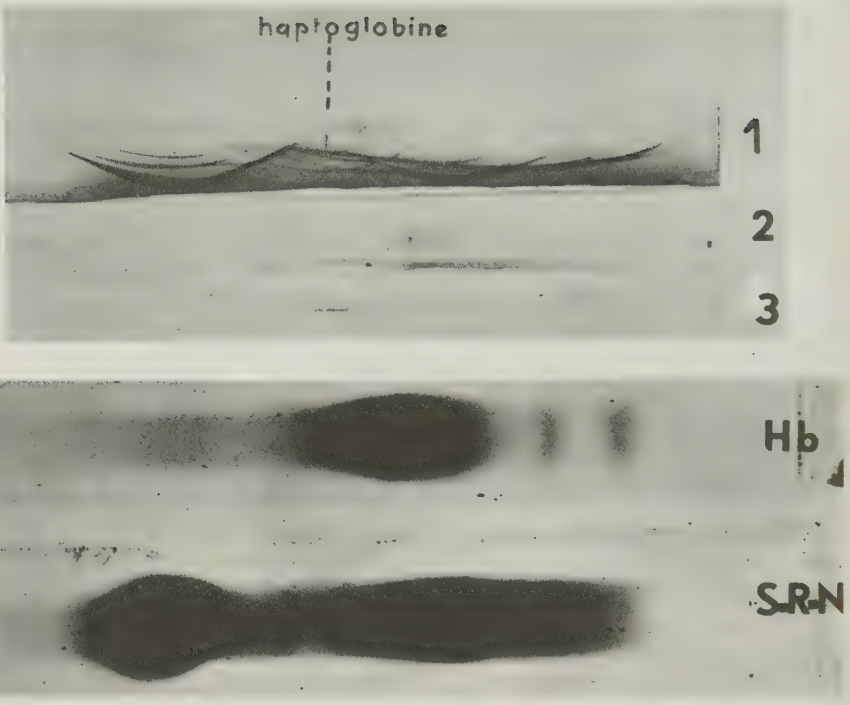


Figure 15 - En haut :
1/ A.I.E. du S.R.N. à pH 8,2
2/ Coloration par la benzidine d'un sérum très hémolysé après A.I.E. développé avec l'immunsérum n° 1.
3/ Id. id. d'un sérum peu hémolysé.
En bas :
E.G. d'un hémolysat des globules rouges (Hb.) et d'un S.R.N. très hémolysé.

lée même avec des antisérums contenant des anticorps antihémoglobine s'expliquerait si l'on suppose que toute l'hémoglobine est combinée à l'haptoglobine ; il ne resterait donc pas de Hb en liberté, tout au moins en quantité suffisante pour former une ligne de précipitation.

Quant au fait que la réaction de caractérisation de l'haptoglobine dans les sérums non hémolysés soit négative, il s'explique parce que la réaction Hb - Hp n'est pas instantanée ; en effet il suffit d'un séjour en glacière d'une nuit du sérum mélangé à l'hémoglobine pour que l'activité de l'α_{2A} réapparaisse.

Le fait que dans les sérums peu hémolysés toute l'hémoglobine est combinée à l'haptoglobine est confirmé par l'expérience suivante :

0,1 ml de Hb, 10 fois diluée, 20 fois diluée et 30 fois diluée sont mélangés à 0,1 ml de S.R.N. normal et laissés en contact 24 heures. Après E.G. dans le premier cas, deux zones d'activité sont décelées ; dans le 2ème cas, encore deux zones, mais la zone β est très faible et dans le 3ème seule l'α_2 est active.

Une preuve définitive qu'il s'agit bien des γ-globulines dans tous les cas est apportée par l'expérience suivante : la fraction 11 est injectée aux lapins. Au bout de quelques semaines d'immunisation on peut constater que l'immunsérum produit contient des anticorps envers toutes les γ-globulines du sérum de Rat. En effet, si on réalise une A.I.E. d'un sérum de Rat avec cet immunsérum, on constate que toute la ligne γ est développée.

La même expérience de chromatographie réalisée avec la fraction B du sérum humain donne des résultats différents puisque le premier tampon élue déjà la totalité des globulines gamma.

En conclusion :

1/ les γ-globulines du sérum de Rat sont très hétérogènes.

2/ il existe des γ-globulines très rapides de mobilité proche de celle de l'albumine.

3/ les γ-globulines sont faciles à séparer par chromatographie sur D.E.A. cellulose.

4/ si cette séparation chromatographie est réalisée à partir de de la fraction B on peut obtenir pures 5 γ-globulines de mobilité différente.

2 - PREPARATION ET ETUDE DE LA SIDEROPHILINE -

Du groupe β_2, la plus importante est la β_{2c}-globuline.

Nous avons isolé cette protéine par chromatographie de la fraction A (surnageant de la précipitation du S.R.N. par acétate cuivrique) sur D.E.A.E. cellulose : 40 ml de fraction A (surnageant de la précipitation de 10 ml de sérum) sont dialysés contre le tampon adéquat, puis placés sur une colonne de 60 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre, et éluée avec un tampon phosphate monopotassique-phosphate dipotassique pH 7, 0,01 molaire en $PO_4^{\equiv}$; la lecture de l'absorption des éluats à 280 mμ indique que la protéine commence à passer dans le tube 10 ; elle atteint son maximum de concentration dans les tubes 17, 18 et 19 ; son passage peut être considéré terminé dans le tube 30 (les éluats ayant un volume de 10 ml).

Les éluats des tubes 17, 18 et 19 présentent une coloration jaune qui devient rouge saumon après concentration.

Le contrôle de la fraction éluée a été fait par E.G. et A.I.E. dans la fraction du tube 18 et dans le mélange des tubes 17 à 30. Aussi bien dans un cas comme dans l'autre, la fraction est homogène à l'électrophorèse et une seule ligne a été décelée à l'A.I.E. Cette ligne correspond à la β_{2c} globuline figure 14. La couleur rouge saumon de cette protéine rappelle la protéine transporteuse de Fe découverte dans le sérum humain par Schade et Caroline (40) et appelée sidérophiline ou transferrine.

La réaction positive avec les réactifs du fer confirme cette hypothèse.

Nous avons calculé le contenu en fer de la sidérophiline par la méthode de Schade (38) qui consiste essentiellement à placer la protéine dans un milieu légèrement acide (pH 5,5) dans lequel le complexe fer-sidérophiline est dissocié, après quoi le Fe libéré est évalué par spectrophotométrie. Comme colorant du fer nous avons employé l'orthophenantroline ferreux - ClH (qualité Merck) et comme réducteurs du Fe^{+++} l'acide ascorbique et le bisulfite de Na.

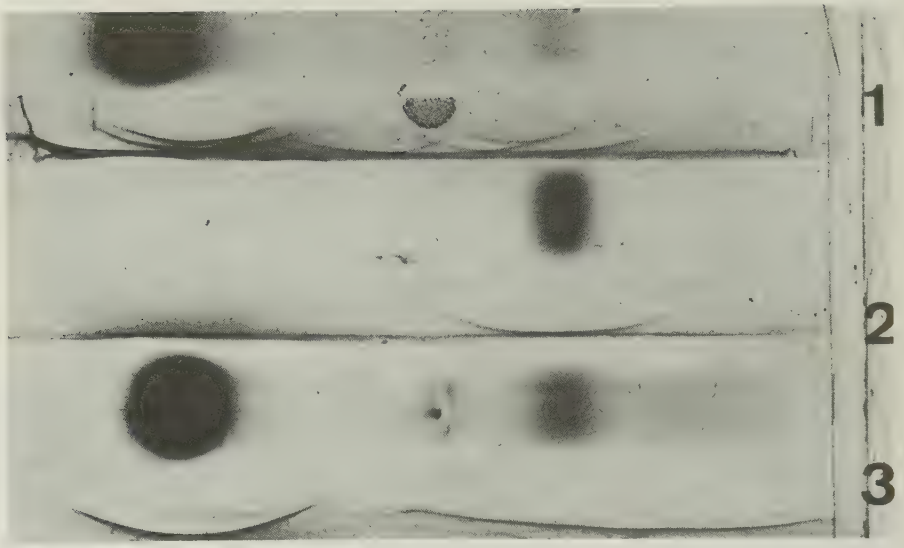


Figure 14 - 1/ E.G. et A.I.E. de la fraction A de précipitation cuivrique.
2/ id. id. d'une préparation de sidérophiline.
3/ id. id. d'un S.R.N.

Le complexe fer-phénantroline est évalué par lecture à 540 mμ. Une courbe étalon a été établie au préalable à partir du sel de Mohr.

La capacité de saturation en Fe a été évaluée par la méthode de Schade et Caroline (40), qui consiste à ajouter une quantité connue de Fe^{++} à la protéine, laquelle est placée dans un tampon à pH 8,2 auquel le complexe Fe-Siderof.n'est pas dissocié. Par mesure spectrophotométrique du fer en excès, on peut calculer par différence avec la quantité de métal ajouté, celui qui a été combiné. De même que pour le calcul du fer contenu dans la transferrine, nous nous sommes servis de l'orthophenantholine ferreux au lieu du bathophenantroline proposé par Schade.

La capacité de saturation a été aussi mesurée par la méthode directe de Schade et coll. (39) dont le principe est : la couleur rouge saumon et donc la D.O. de la sidérophiline augmente progressivement lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de Fe^{++}, jusqu'à ce que la protéine soit saturée après quoi sa D.O. reste stationnaire ou même décroît légèrement du fait de la dilution.

Cette sidérophiline du sérum de Rat présente les caractéristiques suivantes :

- son contenu en fer mesuré par la méthode de Schade est de 1,2 γ de Fe^{++} par mgr de protéine. L'évaluation de la protéine ayant été faite par détermination du contenu en azote et en prenant 7,1 comme facteur de conversion.

La protéine est non saturée en Fe et elle a une capacité d'absorption

de ce métal s'élevant à 3 γ de Fe par mg de protéine (mesure effectuée par la méthode directe de Schade et Caroline, et par la méthode de Schade).

Son spectre d'absorption au visible présente un maximum à γ = 410 mμ.

3 - CARACTERISATION DE L'HAPTOGLOBINE. ETUDE DU COMPLEXE HEMOGLOBINE - HAPTOGLOBINE -

La plus importante des α_2 est l'α_{2A} globuline. Sa ligne à l'A.I.E. apparaît avec tous les antisérums employés, et se caractérise par son trait de précipitation placé entre l'albumine et le réservoir de départ. Nous l'avons identifiée à l'haptoglobine. Cette protéine découverte dans le sérum humain par Polonowsky et Jayle (36) a la propriété de former un complexe avec l'hémoglobine (Hp - Hb), et de ce fait elle peut être mise en évidence par des réactions peroxidasiques de cette protéine.

Nous avons observé que dans les sérums très hémolysés 2 zones d'activité peroxidasique sont décelées, l'une avec une mobilité des α_2, l'autre avec une mobilité intermédiaire des β_1 et β_2, et que dans les sérums peu hémolysés, seule la α_2 est mise en évidence par les réactions peroxydasiques.

La caractérisation par la benzidine dans les hémolysats de globules rouges montre que la zone d'activité peroxydasique de l'hémoglobine est située dans les $\beta_1 - \beta_2$.

La caractérisation après A.I.E. nous a donné les résultats suivants : dans les sérums hémolysés et avec l'antisérum n° 1, deux lignes de colorent par la benzidine ; l'une est l'α_{2A}, l'autre une ligne presque droite ayant une mobilité β_1 - β_2. Dans les sérums peu hémolysés et toujours avec l'antisérum n° 1, seule l'α_{2A} apparaît colorée par réaction avec la benzidine.

Dans l'A.I.E. des sérums très hémolysés développés par l'antisérum n° 2, seule l'α_{2A} est mise en évidence par les réactions peroxydasiques et le même résultat est obtenu avec un sérum peu hémolysé.

Finalement dans le sérum non hémolysé la caractérisation de l'haptoglobine est réalisée par addition d'un peu d'hémoglobine au sérum juste avant l'électrophorèse dans le but de former le complexe Hb - Hp. Nous avons constaté que si on procède de cette manière et qu'on caractérise après par réaction avec la benzidine, seule l'activité de la zone β est mise en évidence après simple électrophorèse, et qu'après l'A.I.E. avec l'antisérum n° 1 une seule ligne se colore (avec une mobilité de β_1 - β_2) et aucune avec l'antisérum n° 2.

Ces résultats s'expliquent de la façon suivante : la zone β_1 - β_2 correspond à l'activité de l'hémoglobine. En effet, la zone d'activité peroxydasique des hémolysats de globules rouges se trouve à cet endroit comme nous l'avons dit figure 14. La α_{2A} serait la protéine fixant l'hémoglobine, donc l'haptoglobine ; d'autre part, l'antisérum n° 1 contiendrait des anticorps antihémoglobine, ce qui ne serait pas le cas de l'antisérum n° 2. En effet, un sérum de lapin antihémoglobine développe dans l'hémoglobine cette ligne β_1 - β_2 ayant une activité peroxydasique.

Dans la figure 15, nous avons représenté l'A.I.E. d'un sérum très hémolysé et d'un sérum peu hémolysé développé avec l'antisérum n° 1.

Le fait que dans les sérums peu hémolysés seule la ligne α_{2A} soit déce-

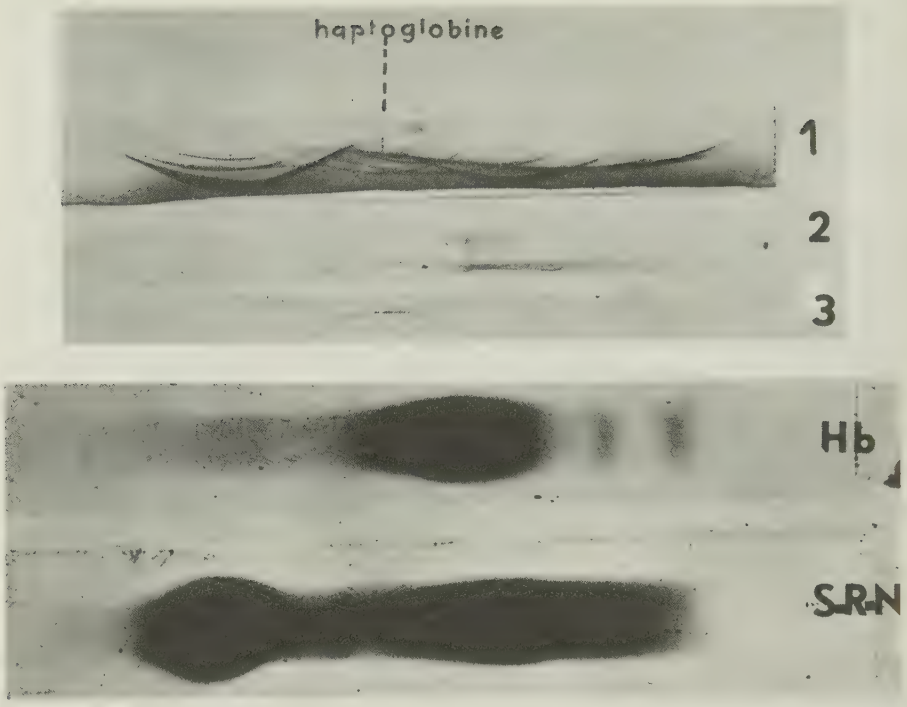


Figure 15 - En haut :

1/ A.I.E. du S.R.N. à pH 8,2

2/ Coloration par la benzidine d'un sérum très hémolysé après A.I.E. développé avec l'immunsérum n° 1.

3/ Id. id. d'un sérum peu hémolysé.

En bas :

E.G. d'un hémolysat des globules rouges (Hb.) et d'un S.R.N. très hémolysé.

lée même avec des antisérums contenant des anticorps antihémoglobine s'expliquerait si l'on suppose que toute l'hémoglobine est combinée à l'haptoglobine ; il ne resterait donc pas de Hb en liberté, tout au moins en quantité suffisante pour former une ligne de précipitation.

Quant au fait que la réaction de caractérisation de l'haptoglobine dans les sérums non hémolysés soit négative, il s'explique parce que la réaction Hb - Hp n'est pas instantanée ; en effet il suffit d'un séjour en glacière d'une nuit du sérum mélangé à l'hémoglobine pour que l'activité de l'α_{2A} réapparaisse.

Le fait que dans les sérums peu hémolysés toute l'hémoglobine est combinée à l'haptoglobine est confirmé par l'expérience suivante :

0,1 ml de Hb, 10 fois diluée, 20 fois diluée et 30 fois diluée sont mélangés à 0,1 ml de S.R.N. normal et laissés en contact 24 heures. Après E.G. dans le premier cas, deux zones d'activité sont décelées ; dans le 2ème cas, encore deux zones, mais la zone β est très faible et dans le 3ème seule l'α_2 est active.

Dans le cas de l'A.I.E. avec l'antisérum n° 1, deux lignes sont mises en évidence pour les dilutions 10 et 20, et seule la ligne α_{2A} à partir de la dilution 30.

Signalons enfin que les sérums antiglobules rouges développent à l'A.I.E. la ligne de mobilité β_1 - β_2, ce qui prouve bien qu'il s'agit en effet de l'hémoglobine.

La technique suivante doit donc être utilisée pour caractériser l'haptoglobine du sérum de Rat :

à 0,1 ml de sérum de Rat frais non hémolysé on ajoute 0,1 ml d'hémoglobine 20 fois diluée. Après un séjour de 24 heures en glacière on peut faire l'électrophorèse et colorer l'haptoglobine par la benzidine dans l'acide acétique (solution saturée), après avoir ajouté quelques gouttes de H_2O_2 (24).

Les principales conclusions de cette étude de l'haptoglobine sont :

- il existe donc une seule protéine qui se combine avec l'hémoglobine.

- contrairement à ce qu'on observe dans le sérum humain, la mobilité de l'haptoglobine ne varie pas lorsqu'on ajoute des quantités variables d'hémoglobine. Ceci a déjà été observé dans les sérums d'autres animaux. (29)

- La formation du complexe n'est pas instantanée.

- La limite de saturation en hémoglobine est de 1 volume d'hémolisats de globules rouges pour 20 volumes de sérum.

4 - ETUDE DES α_1-GLOBULINES -

Nous avons vu que ce groupe de protéines présente la particularité de migrer d'une façon différente lorsque le pH de l'électrophorèse est augmenté, et que cette variation dans la mobilité est typique des α_1-globulines du sérum de Rat.

Puisque dans nos conditions d'expérience nous étions loin du point isolectrique de ces protéines, nous avons cherché les raisons qui pouvaient être à la base du phénomène de ralentissement de la mobilité électrophorétique. Les causes suivantes pouvaient être envisagées :

a) interaction des α_1-globulines et de la sérumalbumine.

b) interaction des α_1 et du support de migration, en l'occurrence gel de gélose.

c) dissociation de ces protéines par effet du tampon, ce qui produirait une altération dans la charge, voire même une dénaturation des protéines.

Nous avons en conséquence fait des préparations de l'albumine et des α_1-globulines par la méthode d'électrophorèse préparative réalisée dans tampon carbonate, qui sépare parfaitement ces deux types de protéines, comme nous l'avons vu (voir chapitre 1). L'emplacement de l'albumine dans la plaque témoin, est plus facile à repérer que celui des α_1-globulines ; de plus, bien que ces protéines soient séparées de l'albumine dans ces conditions d'élec-

trophorèse, elles vont par contre rejoindre le groupe des α_2 ; ceci fait que nos préparations d'albumine étaient pures, alors que les α_1 étaient toujours contaminées par des traces de α_2-globulines.

Les solutions ainsi préparées ont été dialysées contre le tampon véronal 0,025 M pH 8,2 et soumises à nouveau à l'électrophorèse dans ce même tampon. On constate alors que les deux groupes de protéines migrent à nouveau avec la même vitesse qui est d'ailleurs la même que celle qu'elles ont dans le sérum total.

Ceci est représenté dans la figure n° 16.

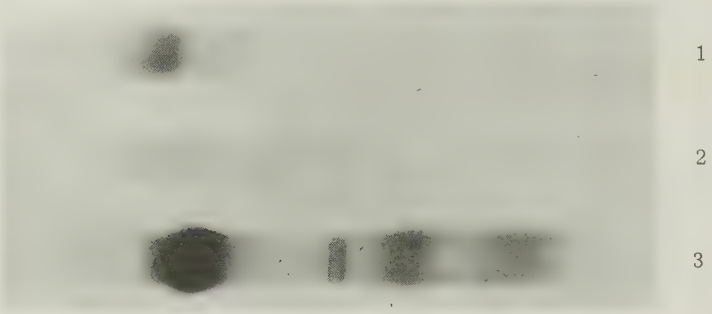


Figure 16 - Electrophorèse en tampon véronal pH 8,2 0,025 M de l'albumine (1) et des α_1-globulines (2) du S.R.N., préparés par électrophorèse préparative en carbonate pH 9,2. (3) S.R.N. témoin.

Pour être rigoureusement exacts, l'albumine est un peu plus rapide mais la différence est si faible que dans le mélange on observe un seul pic électrophorétique. Cette expérience élimine l'hypothèse d'une altération dans la nature des protéines par une dissociation ou autre cause quelconque. Ceci est confirmé de plus par le fait que les autres propriétés des α_1-globulines n'ont pas été changées non plus, par exemple l'antigénicité-, en effet toutes les lignes de précipitation des α_1 sont retrouvées. On retrouve aussi les activités des α_{1C} et α_{1E} estérases et de l'α_{1A} céruloplasmine ; de même que la coloration au noir soudan de l'α_{1E} lipoprotéine. L'hypothèse d'interaction des protéines avec la gélose est aussi à écarter puisque, en gel d'amidon à pH 8,6, les α_1-globulines sont plus lentes que l'albumine comme l'on constate Neahus et coll (33). D'autre part nous avons constaté, qu'à pH 8,2 ces protéines migrent avec la même vitesse, tout comme en gel de gélose.

Nous avons aussi réalisé l'électrophorèse en agarose* une gélose très purifiée où les risques d'interaction protéine-support d'électrophorèse sont moindres (51) ; nous avons retrouvé le même phénomène que dans la gélose.

Enfin l'hypothèse d'une interaction protéine-protéine dans le sérum ne nous semble pas non plus valable, puisque les mesures de mobilité montrent que ces protéines migrent de la même manière lorsqu'elles sont mélangées, que dans leurs solutions pures.

Ceci a été constaté en faisant l'expérience suivante :

Dans une même plaque d'électrophorèse, nous avons placé la préparation

---

* Produit par l'Industrie Biologique Française - Gennevilliers (Seine)

des α_1-globulines, celle de l'albumine, un mélange à parties égales de ces deux solutions protéiques, et un S.R.N. qui sert de témoin. De plus, nous avons placé un échantillon de sérum albumine humaine (S.A.H.). En effet, dans le chapitre n° 1, nous avons parlé d'un ralentissement des α_1 par rapport aux autres protéines du sérum de Rat. Nous avons voulu savoir, en les comparant à la sérum albumine humaine, s'il s'agit effectivement d'un ralentissement ou bien d'une augmentation dans la mobilité des autres protéines. Un échantillon de levane est soumis à l'électrophorèse dans les mêmes conditions.

Les résultats de la mesure de mobilité relative : $\frac{U_x}{U_{S.A.H.}}$ sont exprimés dans le tableau n° 6.

Tableau 6

Tampon	Mobilités relatives $\frac{U_x}{U_{S.A.H.}}$		
		α_1-glob	alb + α_1
Véronal 0,05 M pH 8,3	0,94	0,81	0,86
" 0,05 M pH 8,9	0,93	0,78	-
" 0,05 M pH 9,2	0,94	0,76	0,94 + 0,77

On constate que :

1/ à pH 8,3 les mobilités de ces protéines ne sont pas exactement les mêmes mais elles sont suffisamment rapprochées pour n'enregistrer qu'un seul pic dans le mélange.

2/ à pH 8,8 deux zones sont visibles mais ne sont pas nettes dans le mélange.

3/ à pH 9,2, ces mobilités sont assez éloignées, ce qui permet d'enregistrer deux pics dans le mélange.

4/ la mobilité individuelle de chaque groupe n'est nullement modifiée dans le mélange.

5/ la mobilité de l'albumine ne change pas avec le pH.

6/ par contre, celle des α_1-globulines décroît lorsque le pH augmente.

Nous avons parlé de l'électrophorèse en agarose et nous avons dit que les résultats étaient les mêmes qu'en gélose. En fait il existe une différence, puisqu'en gélose il fallait augmenter le pH et la molarité du tampon d'électrophorèse pour obtenir une séparation des zones α_1 + albumine ; en agarose, la seule augmentation du pH suffit et la molarité du tampon ne semble pas être en cause. Ceci indiquerait que malgré tout il existe une interaction protéines-gélose, mais nous ne saurions dire s'il s'agit de toutes les protéines ou seulement du groupe α_1.

Une autre propriété des α_1-globulines a été mise en évidence avec l'aga-

rose ; si au lieu d'augmenter le pH, on le diminue jusqu'à une valeur proche de 7, on observe que le groupe des α_1-globulines se décompose en deux zones, une plus rapide que l'albumine et qui -comme l'A.I.E. le révèle,- correspond aux deux α_1 principales α_{1B} et α_{1D}, et une zone plus lente que l'albumine et qui comprend l'α_{1C} et l'α_{1A}. Ceci est représenté dans la figure n° 17.

Ces résultats rejoignent ceux d'Anderson et coll (1) qui ont étudié les mobilités des protéines du sérum de Rat en veine liquide à des pH inférieurs à 8.

Nous terminerons enfin notre exposé en signalant qu'une nouvelle protéine a été décelée à l'A.I.E. avec l'antisérum n° 4 lors de notre étude des α_1-globulines. La ligne de précipitation de cette protéine est située à l'intérieur de l'arc de l'albumine figure 18. Elle est plus rapide que celle-ci. Malgré ceci nous l'avons classée dans les α_1-globulines puisqu'elle possède les propriétés de ces protéines et qu'une protéine analogue a été décrite dans le sérum humain (15). Cette protéine a été appelée α_{1D}.

En conclusion, le ralentissement de la mobilité des α_1 avec le pH est un phénomène qui est lié à la nature même de ces protéines ; autrement dit, l'augmentation du pH produit une variation dans la charge électrique de la protéine mais ne dénature pas pour autant les protéines.

De plus, si à pH supérieur à 8 la propriété concerne toutes les α_1-globulines, à pH inférieur à 8 la variation est différente : alors que les deux α_1 principales sont plus rapides, les autres sont plus lentes que l'albumine.

Dans le cas de l'A.I.E. avec l'antisérum n° 1, deux lignes sont mises en évidence pour les dilutions 10 et 20, et seule la ligne α_{2A} à partir de la dilution 30.

Signalons enfin que les sérums antiglobules rouges développent à l'A.I.E. la ligne de mobilité β_1 - β_2, ce qui prouve bien qu'il s'agit en effet de l'hémoglobine.

La technique suivante doit donc être utilisée pour caractériser l'haptoglobine du sérum de Rat :

à 0,1 ml de sérum de Rat frais non hémolysé on ajoute 0,1 ml d'hémoglobine 20 fois diluée. Après un séjour de 24 heures en glacière on peut faire l'électrophorèse et colorer l'haptoglobine par la benzidine dans l'acide acétique (solution saturée), après avoir ajouté quelques gouttes de H_2O_2 (24).

Les principales conclusions de cette étude de l'haptoglobine sont :

- il existe donc une seule protéine qui se combine avec l'hémoglobine.

- contrairement à ce qu'on observe dans le sérum humain, la mobilité de l'haptoglobine ne varie pas lorsqu'on ajoute des quantités variables d'hémoglobine. Ceci a déjà été observé dans les sérums d'autres animaux. (29)

- La formation du complexe n'est pas instantanée.

- La limite de saturation en hémoglobine est de 1 volume d'hémolisats de globules rouges pour 20 volumes de sérum.

4 - ETUDE DES α_1-GLOBULINES -

Nous avons vu que ce groupe de protéines présente la particularité de migrer d'une façon différente lorsque le pH de l'électrophorèse est augmenté, et que cette variation dans la mobilité est typique des α_1-globulines du sérum de Rat.

Puisque dans nos conditions d'expérience nous étions loin du point isolectrique de ces protéines, nous avons cherché les raisons qui pouvaient être à la base du phénomène de ralentissement de la mobilité électrophorétique. Les causes suivantes pouvaient être envisagées :

a) interaction des α_1-globulines et de la sérumalbumine.

b) interaction des α_1 et du support de migration, en l'occurrence gel de gélose.

c) dissociation de ces protéines par effet du tampon, ce qui produirait une altération dans la charge, voire même une dénaturation des protéines.

Nous avons en conséquence fait des préparations de l'albumine et des α_1-globulines par la méthode d'électrophorèse préparative réalisée dans tampon carbonate, qui sépare parfaitement ces deux types de protéines, comme nous l'avons vu (voir chapitre 1). L'emplacement de l'albumine dans la plaque témoin, est plus facile à repérer que celui des α_1-globulines ; de plus, bien que ces protéines soient séparées de l'albumine dans ces conditions d'élec-

trophorèse, elles vont par contre rejoindre le groupe des α_2 ; ceci fait que nos préparations d'albumine étaient pures, alors que les α_1 étaient toujours contaminées par des traces de α_2-globulines.

Les solutions ainsi préparées ont été dialysées contre le tampon véronal 0,025 M pH 8,2 et soumises à nouveau à l'électrophorèse dans ce même tampon. On constate alors que les deux groupes de protéines migrent à nouveau avec la même vitesse qui est d'ailleurs la même que celle qu'elles ont dans le sérum total.

Ceci est représenté dans la figure n° 16.

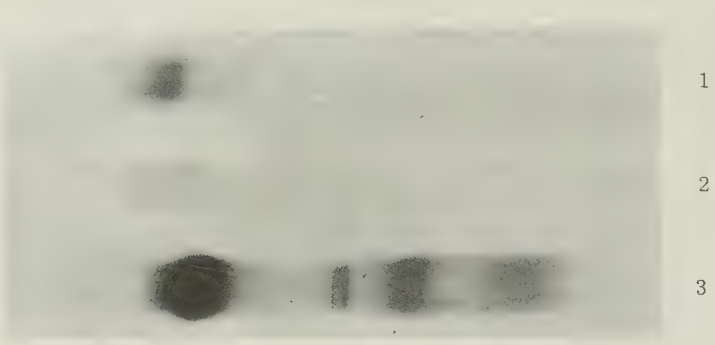


Figure 16 - Electrophorèse en tampon véronal pH 8,2 0,025 M de l'albumine (1) et des α_1-globulines (2) du S.R.N., préparés par électrophorèse préparative en carbonate pH 9,2. (3) S.R.N. témoin.

Pour être rigoureusement exacts, l'albumine est un peu plus rapide mais la différence est si faible que dans le mélange on observe un seul pic électrophorétique. Cette expérience élimine l'hypothèse d'une altération dans la nature des protéines par une dissociation ou autre cause quelconque. Ceci est confirmé de plus par le fait que les autres propriétés des α_1-globulines n'ont pas été changées non plus, par exemple l'antigénicité-, en effet toutes les lignes de précipitation des α_1 sont retrouvées. On retrouve aussi les activités des α_{1C} et α_{1E} estérases et de l'α_{1A} céruloplasmine ; de même que la coloration au noir soudan de l'α_{1E} lipoprotéine. L'hypothèse d'interaction des protéines avec la gélose est aussi à écarter puisque, en gel d'amidon à pH 8,6, les α_1-globulines sont plus lentes que l'albumine comme l'on constate Neahus et coll (33). D'autre part nous avons constaté, qu'à pH 8,2 ces protéines migrent avec la même vitesse, tout comme en gel de gélose.

Nous avons aussi réalisé l'électrophorèse en agarose* une gélose très purifiée où les risques d'interaction protéine-support d'électrophorèse sont moindres (51) ; nous avons retrouvé le même phénomène que dans la gélose.

Enfin l'hypothèse d'une interaction protéine-protéine dans le sérum ne nous semble pas non plus valable, puisque les mesures de mobilité montrent que ces protéines migrent de la même manière lorsqu'elles sont mélangées, que dans leurs solutions pures.

Ceci a été constaté en faisant l'expérience suivante :

Dans une même plaque d'électrophorèse, nous avons placé la préparation

---

* Produit par l'Industrie Biologique Française - Gennevilliers (Seine)

des α_1-globulines, celle de l'albumine, un mélange à parties égales de ces deux solutions protéiques, et un S.R.N. qui sert de témoin. De plus, nous avons placé un échantillon de sérum albumine humaine (S.A.H.). En effet, dans le chapitre n° 1, nous avons parlé d'un ralentissement des α_1 par rapport aux autres protéines du sérum de Rat. Nous avons voulu savoir, en les comparant à la sérum albumine humaine, s'il s'agit effectivement d'un ralentissement ou bien d'une augmentation dans la mobilité des autres protéines. Un échantillon de levane est soumis à l'électrophorèse dans les mêmes conditions.

Les résultats de la mesure de mobilité relative : $\frac{U_x}{U_{S.A.H.}}$ sont exprimés dans le tableau n° 6.

Tableau 6

Tampon	Mobilités relatives $\frac{U_x}{U_{S.A.H.}}$		
		α_1-glob	alb + α_1
Véronal 0,05 M pH 8,3	0,94	0,81	0,86
" 0,05 M pH 8,9	0,93	0,78	-
" 0,05 M pH 9,2	0,94	0,76	0,94 + 0,77

On constate que :

1/ à pH 8,3 les mobilités de ces protéines ne sont pas exactement les mêmes mais elles sont suffisamment rapprochées pour n'enregistrer qu'un seul pic dans le mélange.

2/ à pH 8,8 deux zones sont visibles mais ne sont pas nettes dans le mélange.

3/ à pH 9,2, ces mobilités sont assez éloignées, ce qui permet d'enregistrer deux pics dans le mélange.

4/ la mobilité individuelle de chaque groupe n'est nullement modifiée dans le mélange.

5/ la mobilité de l'albumine ne change pas avec le pH.

6/ par contre, celle des α_1-globulines décroît lorsque le pH augmente.

Nous avons parlé de l'électrophorèse en agarose et nous avons dit que les résultats étaient les mêmes qu'en gélose. En fait il existe une différence, puisqu'en gélose il fallait augmenter le pH et la molarité du tampon d'électrophorèse pour obtenir une séparation des zones α_1 + albumine ; en agarose, la seule augmentation du pH suffit et la molarité du tampon ne semble pas être en cause. Ceci indiquerait que malgré tout il existe une interaction protéines-gélose, mais nous ne saurions dire s'il s'agit de toutes les protéines ou seulement du groupe α_1.

Une autre propriété des α_1-globulines a été mise en évidence avec l'aga-

rose ; si au lieu d'augmenter le pH, on le diminue jusqu'à une valeur proche de 7, on observe que le groupe des α_1-globulines se décompose en deux zones, une plus rapide que l'albumine et qui -comme l'A.I.E. le révèle,- correspond aux deux α_1 principales α_{1B} et α_{1D}, et une zone plus lente que l'albumine et qui comprend l'α_{1C} et l'α_{1A}. Ceci est représenté dans la figure n° 17.

Ces résultats rejoignent ceux d'Anderson et coll (1) qui ont étudié les mobilités des protéines du sérum de Rat en veine liquide à des pH inférieurs à 8.

Nous terminerons enfin notre exposé en signalant qu'une nouvelle protéine a été décelée à l'A.I.E. avec l'antisérum n° 4 lors de notre étude des α_1-globulines. La ligne de précipitation de cette protéine est située à l'intérieur de l'arc de l'albumine figure 18. Elle est plus rapide que celle-ci. Malgré ceci nous l'avons classée dans les α_1-globulines puisqu'elle possède les propriétés de ces protéines et qu'une protéine analogue a été décrite dans le sérum humain (15). Cette protéine a été appelée α_{1D}.

En conclusion, le ralentissement de la mobilité des α_1 avec le pH est un phénomène qui est lié à la nature même de ces protéines ; autrement dit, l'augmentation du pH produit une variation dans la charge électrique de la protéine mais ne dénature pas pour autant les protéines.

De plus, si à pH supérieur à 8 la propriété concerne toutes les α_1-globulines, à pH inférieur à 8 la variation est différente : alors que les deux α_1 principales sont plus rapides, les autres sont plus lentes que l'albumine.

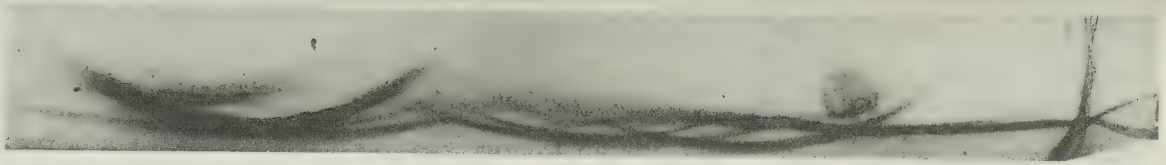


Figure 17 - Analyse immunoélectrophorétique du S. R. N., réalisée en agarose en tampon pH 7, 0,025 M dans le gel.

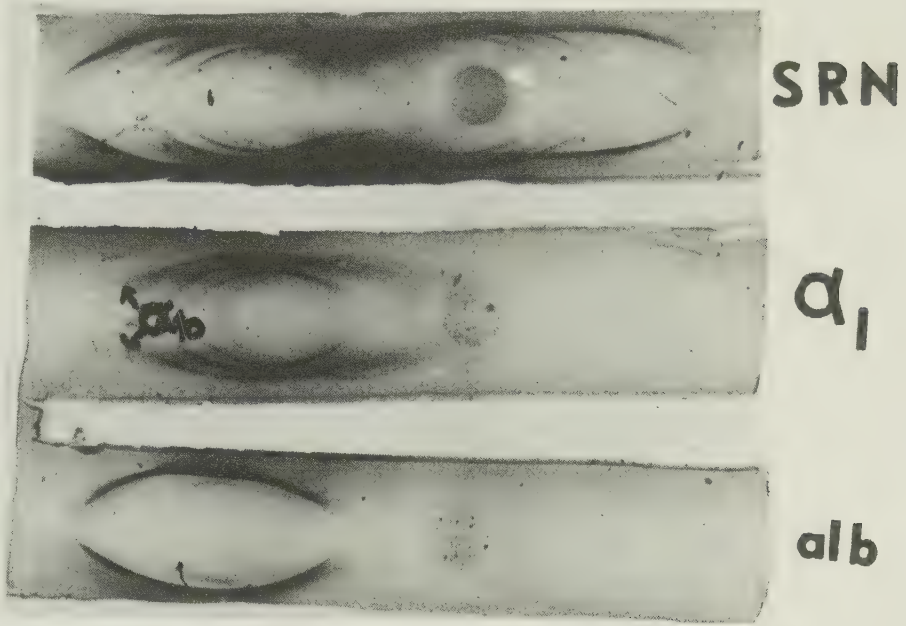


Figure 18 - A.I.E. en agarose, avec tampon véronal pH 8,8, du S.R.N. et des α_1-globulines et de l'albumine séparées par électrophorèse préparative. Délimitation de l'α_{10}-globuline.

CINQUIÈME CHAPITRE

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS PRINCIPALES

1 - DISCUSSION -

Dans nos conditions expérimentales, les résultats de l'électrophorèse que nous avons obtenus tout au long de notre travail ont été suffisamment reproductibles pour pouvoir établir un modèle de référence. Sur ce modèle nous avons calculé la répartition quantitative des protéines et les mobilités électrophorétiques. Cependant dans certains lots de sérum, de légères variations dans les diagrammes ont pu être observées ; c'est pourquoi nos données des mobilités et des pourcentages protéiques ne peuvent être considérés que comme des valeurs moyennes.

En ce qui concerne la détermination des zones électrophorétiques, si l'on prend la courbe de l'enregistrement photométrique comme critère pour les délimiter, le sérum de Rat comprendrait seulement trois zones. En effet, la courbe densitométrique présente uniquement trois maxima qui correspondent aux zones albumine, β_2-globulines et γ-globulines.

Cependant d'autres zones sont visibles après l'E.G. à pH 8,2. Ces zones, nous les avons délimitées comme suit : la zone rho, dès le commencement de la courbe jusqu'au d'abut du pic de l'albumine ; la zone α_2 du bas du pic de l'albumine jusqu'au réservoir de départ de l'électrophorèse ; la zone β_1 du réservoir de départ jusqu'au début du pic de la zone β_2.

La délimitation des zones après simple électrophorèse reste donc un peu arbitraire. Néanmoins, l'A.I.E. permet de préciser que les zones ainsi délimitées correspondent bien à des groupes de protéines de mobilités différentes. En effet chacune des zones ainsi définies renferme des protéines dont les lignes de précipitation sont situées à l'intérieur de chaque zone et non à cheval sur l'une ou l'autre. Font exception l'$\alpha_{1\varepsilon}$ de mobilité intermédiaire entre les α_2 et les α_1, et les protéines ρ qui donnent lieu a des lignes de précipitation peut incurvées et pour lesquelles il est difficile de décider si elles se trouvent entièrement en dehors de la zone de l'albumine.

Pour nommer les protéines nous avons conservé la nomenclature proposée par Grabar, qui utilise des lettres grecques pour définir les zones d'électrophorèse et des lettres majuscules pour définir les constituants individuels à l'intérieur de chaque zone.

Le nombre total de constituants dénombrés s'élève à 21. Mais on doit s'attendre à en trouver d'autres, puisque par exemple, la partie la plus rapide de la zone rho, bien définie à l'électrophorèse et possédant une forte activité estérasique, ne donne pas de lignes de précipitation. Aussi nous

avons décrit l'existence de deux β_1-globulines dans une fraction éluée sur CM cellulose, qui n'ont pas été dénombrées dans l'A.I.E. du sérum total.

Récemment, David, Benjamin et Weimer (3) ont décelé 25 constituants dans le sérum de Rat.

Pour définir les constituants après l'analyse immunoélectrophorétique, nous avons utilisé les lettres A B C D E, au fur et à mesure de l'identification de nouvelles lignes. Cette nomenclature tient compte exclusivement de la mobilité des lignes de précipitation - maximum de courbure de la ligne et indique des mobilités décroissantes de A à E.

Cependant dans certains cas, ce critère de nomenclature qui tient compte uniquement de la mobilité électrophorétique n'a pas été rigoureusement suivi.

C'est le cas de l'α_{1E}. Cette ligne devrait être classée dans le groupe des α_2 par sa mobilité. Mais elle possède la propriété des α_1 de varier de mobilité lorsqu'on augmente légèrement le pH de l'électrophorèse ; aussi nous l'avons inclu dans le groupe α_1.

Une autre exception est la protéine α_{10} qui par sa mobilité serait une protéine rho ; la justification de la nomination α_{10} a été discutée dans le chapitre IV. Enfin, l'exemple le plus typique est celui des globulines gamma qui s'étendent sur plusieurs zones de mobilité, et celui des β_3-globulines, non définies par simple électrophorèse. Malgré ces réserves, dans la plupart des cas, le seul critère de mobilité immunoélectrophorétique nous a suffi pour définir les protéines. C'est notamment le cas des constituants les plus importants qui donnent lieu à des arcs de précipitation bien définis.

Cependant, dans certains cas, lorsque les lignes ont des mobilités voisines, il peut être difficile de décider de l'emplacement exact de leurs maxima de courbure. Tel est le cas de l'α_{1A} et l'α_{1C} dont les arcs sont presque superposés. Lorsque nous les avons caractérisées l'une par ses propriétés oxidasiques, α_{1A}, l'autre par son activité estérasique, α_{1C}, nous avons constaté qu'effectivement l'α_{1A} est légèrement plus rapide.

Il serait donc souhaitable de pouvoir définir les protéines par une troisième propriété, d'autant plus que la nomenclature basée sur le seul critère de mobilité n'est valable que pour des conditions précises de molarité et de pH du tampon d'électrophorèse.

C'est pourquoi les colorations spéciales après l'E.G. et l'A.I.E. sont des auxiliaires précieux.

Ces colorations nous ont permis de caractériser l'α_{1C} par ses propriétés estérasiques ; l'α_{2A} par sa propriété de se combiner à l'hémoglobine et les α_{1E} et ρ_1 par la double propriété d'être colorées par le noir Soudan et d'hydroliser l'acétate de β-naphtyle. Malheureusement beaucoup de protéines restent encore non caractérisées par ces méthodes.

Dans d'autres cas, les protéines ne sont pas mises en évidence après l'A.I.E. soit par manque d'anticorps, soit parce qu'elles se trouvent en quantités très faibles. Ainsi une forte coloration des lipoprotéines est observée dans le groupe des α_1 après simple électrophorèse et seulement l'α_{1E} après l'A.I.E. Dans nos premières expériences aucune ligne possédant une activité estérasique n'avait été décelée ; cependant, par la suite, une prise d'essai plus important et une plus grande concentration des immunsérums nous ont permis de déceler trois lignes d'activité estérasique.

De même, une activité β_1 estérasique a été observée, après l'électrophorèse d'une des fractions éluées sur D.E.A.E. cellulose.

Ceci montre l'intérêt de l'emploi de plusieurs critères simultanément, voire même de plusieurs méthodes de travail à la fois. Un autre exemple est le cas de la mise en évidence de la céruloplasmine. Une caractérisation directe sur les plaques d'électrophorèse ou de l'A.I.E. nous avait donné des résultats négatifs. D'autres auteurs signalent également cette absence d'activité oxydasique typique de la céruloplasmine dans d'autres sérums. Cependant, la première fraction éluée sur CM-cellulose est colorée en bleu et fait penser à une protéine contenant du cuivre, ce qui est confirmé par la réaction positive obtenue dans les éluats, avec les réactifs de ce métal. Des recherches de l'activité oxydasique ont permis de montrer que cette activité existe, mais que le pH optimum d'activité est différent de celui de la céruloplasmine humaine. Ceci nous a permis de caractériser cette protéine dans les plaques de l'E.G. et de l'A.I.E. La ligne de précipitation de cette protéine à l'A.I.E. est presque superposée sur celle de l'albumine et aussi à celle de l'α_{1C} ; une électrophorèse réalisée à pH 8,8 nous a permis de montrer qu'elle appartient au groupe α_1. De plus, une double coloration réalisée sur la même plaque, après l'A.I.E. à pH 8,8 nous a permis de bien caractériser l'α_{1C} comme ayant une activité estérasique et l'α_{1A} comme étant la céruloplasmine. L'électrophorèse effectuée dans les tampons de pH 8,6 ou 8,8 nous paraît donc plus intéressante qu'à pH 8,2, puisque la séparation de la zone albumine et α_1 est très nette et que les autres protéines ne sont pas modifiées. Un pH trop alcalin n'est évidemment pas souhaitable de même qu'une trop grande force ionique, mais nous avons montré qu'il suffisait d'un pH de l'ordre de 8,6 pour obtenir une séparation suffisante pour différencier une α_1-globuline de l'albumine par simple électrophorèse.

Il est vrai que l'A.I.E. permet de bien distinguer les α_{1B} et α_{1D} (les deux plus importantes α_1) de l'albumine, même si ces protéines ont la même mobilité, puisque les arcs de précipitation de ces protéines sont très différents. De même, les α_{1A} et α_{1C} qui donnent lieu à des lignes de précipitation beaucoup moins importantes que l'albumine, ne peuvent pas être confondues avec cette protéine. Mais la différenciation est beaucoup plus difficile lorsqu'il s'agit d'examiner soit par l'E.G. soit par l'A.I.E. des préparations de ces protéines. Tel a été le cas des fractions éluées sur D.E.A.E. cellulose avec le système discontinu ; nous avons séparé l'albumine avec le 3ème tampon et les α_{1B} et α_{1D} globulines avec le 4ème. L'A.I.E. ne nous avait pas permis de décider de l'idendité de ces fractions, puisqu'en plus d'avoir la même mobilité les α_{1B} et α_{1D} donnent lieu à des arcs de précipitation très importants et de forme semblable à celui de l'albumine. L'A.I.E. à pH 8,6 ou 8,8 nous a permis de décider sur l'identité de ces protéines.

La chromatographie sur D.E.A.E. cellulose nous a permis de séparer des groupes de protéines et de tirer des renseignements sur leur comportement. Tel est le cas de la zone d'activité β estérasique non décelée dans le sérum total, ce qui sans doute dû à un défaut de concentration.

De plus, nous avons observé que les α_1-globulines sont éluées de la colonne après l'albumine contrairement à ce qui se passe dans le sérum humain (19).

Les γ-globulines se comportent aussi différemment que les γ globulines humaines. En effet dans le sérum humain, le 1er tampon (phosphate 0,01 M, pH 7) élue les γ-globulines lentes et rapides ; dans le sérum de Rat seules

les γ-globulines lentes sont éluées par ce tampon, et on retrouve des γ-globulines dans les fractions éluées avec d'autres tampons. Ceci met en évidence le caractère hétérogène des γ-globulines de Rat. Le caractère hétérogène des γ-globulines a pu être mieux étudié grâce à la précipitation par l'acétate cuivrique.

La fraction B de cette précipitation contient qualitativement et quantitativement la totalité des γ-globulines. Les fractions obtenues par passage sur D.E.A.E. cellulose de cette fraction B sont donc beaucoup moins complexes que celles du fractionnement du sérum total.

C'est ainsi que nous avons pu isoler 11 γ-globulines, dont 5 à l'état pur, calculer les mobilités électrophorétiques et montrer par la méthode de double diffusion qu'il s'agit bien de γ-globulines.

Nous avons aussi constaté que chaque tampon élue des protéines bien définies comme le prouve l'expérience suivante : nous avons mélangé deux fractions éluées avec deux tampons différents (en l'occurence les tampons de molarité 0,02 et 0,05) et nous les avons passées a nouveau sur colonne de D.E.A.E. cellulose avec plusieurs tampons. Seuls les deux tampons cités éluent à nouveau ces γ-globulines qui sont d'ailleurs, les mêmes que celles obtenues après le premier fractionnement puisqu'elles ont la même mobilité.

Un autre exemple : la fraction éluée avec le 2ème tampon est répartie uniformément dans plusieurs éluats, c'est-à-dire qu'elle donne lieu à un pic très étalé. Nous avons fait trois prélèvements de cette fraction (éluats du début, du milieu et de la fin du pic chromatographique). Nous avons constaté qu'il s'agit partout de la même protéine (même mobilité). De plus, les résultats de plusieurs colonnes sont concordants. Cette propriété semble particulière au sérum de Rat. En effet, la même expérience effectuée sur la fraction B du sérum humain donne des résultats différents. Ici, toutes les γ-globulines sont éluées avec le premier tampon 0,01 M, et les autres tampons n'éluent pratiquement rien.

La caractérisation de la sidérophiline a pu être réalisée grâce à sa préparation sur colonne de D.E.A.E. cellulose, à partir du surnageant de la précipitation cuivrique. Cette protéine est quantitativement très importante dans le sérum de Rat.

La caractérisation directe dans les plaques, au moyen des réactifs du Fe, ne nous a pas donné de résultats positifs, ce qui est sans doute du à la faible teneur en ce métal. Nous avons pu l'isoler, ce qui nous a permis une caractérisation directe et, de plus, l'obtention quantitative de la protéine à l'état pur. Nous avons donc pu étudier ses propriétés et constater ainsi que, comme nous avions pu l'observer avec d'autres protéines du Rat, la sidérophiline présente des particularités vis à vis de son homologue de sérum humain. Ainsi, bien qu'elle ait le même rôle en tant que protéine transporteuse du Fe, certaines propriétés ne sont pas les mêmes ; telle que la mobilité électrophorétique (la sidérophiline humaine se place dans la zone β_1) et les spectres d'absorption dans le visible, alors que le maximum d'absorption se place à γ = 420 mμ pour la transferrine humaine, il est de γ = 410 mμ pour cette même protéine chez le Rat. De plus, la teneur en Fe est plus élevée pour la protéine du Rat. Mais cette dernière constatation doit être considérée avec certaines réserves puisque les valeurs de la teneur en Fe et la capacité d'absorption de ce métal varient d'un lot de rats à l'autre et que seuls des chiffres moyens déduits d'un examen statique sont significatifs. On peut toutefois affirmer que, tout comme dans le cas du sérum humain, seulement un tiers des molécules contiennent du fer.

En ce qui concerne l'haptoglobine, nous avons pu observer que cette protéine présente également des singularités, tout en possédant les mêmes propriétés essentielles. Ces singularités ont été discutées lors de l'exposé des résultats. Rappelons ici seulement le fait que la réaction Hb - Hp n'est pas immédiate ce qui est important dans la caractérisation de cette protéine. Le cas des globulines de la zone α_1, zone riche en protéines, représente la plus importante des particularités du sérum de Rat. Ces particularités ont déjà été amplement discutées dans les chapitres II et IV.

Signalons ici seulement l'intérêt que présente la particularité de varier d'une manière différente selon le pH pour

1/ les identifier.

2/ les préparer par électrophorèse préparative en gel de gélose.

2 - CONCLUSIONS -

L'étude du *sérum de Rat* a été effectuée en utilisant l'électrophorèse en gélose à pH 8,2 et l'analyse immunoélectrophorétique. Ces méthodes ont également été employées en faisant varier les pH de 7 à 9.

Des techniques spéciales de caractérisation ont été utilisées pour l'identification des protéines par des propriétés chimiques ou par des activités enzymatiques.

Diverses techniques ont été utilisées pour fractionner le sérum de Rat afin d'obtenir, soit des protéines pures, soit des groupes de protéines plus restreints et plus faciles à étudier.

Les expériences ont toujours été réalisées sur des mélanges de sérums de plusieurs rats. Les mobilités électrophorétiques et les pourcentages protéiques sont des valeurs moyennes, obtenues après examen de plusieurs mélanges de sérums. Les résultats obtenus après l'analyse immunoélectrophorétique sont donnés d'après les examens de plusieurs mélanges, étudiés à l'aide de quatre immunsérums différents.

Les principaux résultats de l'étude des protéines sériques du rat sont détaillés ci-dessous :

Compte tenu des observations que nous avions faites antérieurement, nous avons constaté que le sérum de Rat présente, à l'électrophorèse en gélose dans un tampon véronal de 0,025 M, pH 8,2, six zones électrophorétiques qui sont, dans l'ordre de mobilités décroissantes :

Zone 1 : protéine rho	Zone 4 : β_1-globulines
Zone 2 : albumine + α_1-glob.	Zone 5 : β_2-globulines
Zone 3 : α_2-globulines	Zone 6 : γ -globulines

Les mobilités électrophorétiques de ces protéines, calculées en prenant comme valeur de référence celle de la sérumalbumine humaine sont :

Zone 1 : 7,25 - 6,15
Zone 2 : 6,15 - 4,80
Zone 3 : 4,80 - 3,65
Zone 4 : 3,65 - 3,05
Zone 5 : 3,05 - 1,90
Zone 6 : 1,90 - 0,50

$(10^{-5}\ cm^2\ volt^{-1}\ sec^{-1})$

Les pourcentages protéiques, obtenus par l'enregistrement photométric des bandes d'électrophorèse colorées au Noir Amide, nous donnent les résultats suivants : 5 %, 51 %, 7 %, 6 %, 20 % et 11 % pour les zones 1, 2, 3, 4, 5 et 6 respectivement.

Mais en réalité, les protéines des diverses zones se suivent sans discontinuité et sans que l'on puisse observer une séparation nette entre elles. Seules les zones 2 et 5 correspondent à de vrais maxima dans la courbe d'enregistrement photométrique. Néanmoins les six zones bien délimitées que nous avons observées correspondent à des groupes de protéines de mobilités différentes, comme le montre l'analyse immunoélectrophorétique. Cette dernière méthode nous a permis de montrer la complexité de chaque zone électrophorétique et de mettre en évidence 21 constituants au total. Pour désigner ces constituants, nous avons proposé une nomenclature qui, en principe, ne tient compte que de la mobilité électrophorétique ; mais dans certains cas, elle a pu être complétée grâce à l'utilisation d'une troisième propriété pour la caractérisation de certaines protéines. C'est le cas des protéines suivantes : rho-lipoprotéine et estérase, α_{1C}-estérase, α_{1A}-céruloplasmine, α_{1E}-lipoprotéine, α_{1A}-haptoglobine, β_{1C}-sidérophiline.

Deux faits principaux ressortent de ces analyses électrophorétiques et immunoélectrophorétiques :

- d'une part, l'albumine est plus lente que celle des sérums d'autres mammifères,

- d'autre part, quatre α_1-globulines ont la même mobilité que l'albumine ; l'une de ces protéines donnant un arc de précipitation situé pratiquement au même endroit que celui de l'albumine.

Nous avons constaté que, si la molarité et le pH du tampon d'électrophorèse sont augmentés, la zone 2 est scindée en deux parties, la plus rapide correspondant à l'albumine et l'autre aux α-globulines. Les meilleurs résultats ont été obtenu avec un tampon 0,05 M pH 9,2. D'autre part, la position relative des autres protéines entre elles n'étant pas affectée, l'électrophorèse effectuée dans ces conditions permet une meilleure résolution des protéines du sérum. A pH 9,0, avec un tampon véronal 0,05 M, on peut distinguer sept zones électrophorétiques dont la zone de l'albumine et celle des α_1-globulines sont parfaitement séparées et correspondent à deux pics dans la courbe photométrique. Ainsi, cette manière d'opérer facilite la distinction de ces protéines. Les α_1-globulines étant facilement reconnaissables entre elles (l'une étant la céruloplasmine, deux des estérases et deux donnant lieu à des arcs de précipitation très caractéristiques qui apparaissent avec tous nos immunsérums), nous avons donc ainsi six protéines parfaitement caractérisées.

De la mesure des mobilités relatives, nous avons pu déduire que la mobilité de l'albumine n'est pas affectée dans les conditions d'expérience que nous avons employées mais que toutes les α_1-globulines du groupe migrent moins vite si l'on fait varier le pH du tampon d'électrophorèse.

Nous avons fractionné le sérum de Rat par chromatographie sur colonnes de D.E.A.E. et de CM-celluloses. L'élution a été effectuée d'une façon analogue à celle utilisée, pour le sérum humain, par d'autres auteurs.

D'une façon générale, les protéines du sérum de Rat sont éluées d'une colonne de D.E.A.E.-cellulose dans l'ordre de leurs mobilités croissantes, comme dans le cas du sérum humain, c'est-à-dire d'abord les globulines et, à la fin, les protéines rho. Cependant, de légères variations ont pu être observées :

- les γ-globulines obtenues les premières renferment uniquement la fraction la plus lente et sont toujours contaminées par la β_2C-globuline ;

- de plus, on retrouve des γ-globulines de différentes mobilités dans pratiquement toutes les fractions éluées avec tous les tampons ;

- les α_1-globulines sont éluées de la colonne après l'albumine, ce qui est une autre caractéristique des α_1-globulines, bien que ceci semble concerner uniquement les deux α_1-globulines principales, c'est-à-dire l'α_{1s} et l'α_{1D}-globulines.

Le fractionnement sur colonne de CM-cellulose se fait également comme pour les protéines du sérum humain, mais les fractions obtenues sont beaucoup plus hétérogènes que celles éluées d'une colonne de D.E.A.E.-cellulose. Cependant, cette séparation nous a permis de caractériser la céruloplasmine. Nous avions essayé, sans résultat, de caractériser cette protéine selon la technique employée pour la céruloplasmine humaine. Nous avions donc conclu à l'absence d'une protéine analogue dans le sérum de Rat. Or, la première fraction éluée d'une colonne de CM-cellulose, dans nos conditions expérimentales, est de couleur bleue et une réaction positive avec les réactifs du cuivre a pu être observée dans cette fraction. Nous avons donc cherché le pH de l'activité oxydasique ; nous avons trouvé que ce pH se situe aux environs de 5 alors que la céruloplasmine humaine oxyde la p-phenylènediamine à pH 6,7. A partir de ces résultats, nous avons pu mettre au point la caractérisation de la céruloplasmine du sérum de Rat et nous avons constaté qu'il s'agit de la α_{1A}-globuline.

Le fractionnement du sérum de Rat normal, par la méthode de l'acétate cuivrique, nous a permis de séparer, dans le précipité, la totalité des γ-globulines (lentes et rapides) et ceci quantitativement. En utilisant cette méthode, nous avons pu observer que le sérum de Rat précipite d'une façon analogue au sérum humain. Néanmoins, nous avons noté des différences, notamment, la précipitation des β_3-globulines qui, par ailleurs, semblent faire partie du groupe des immunoglobulines.

A partir du précipité du fractionnement cuivrique, nous avons donc pu étudier les γ-globulines. En effet, ce groupe de protéines présente un grand intérêt du fait de son hétérogénéité. Nous avions déjà observé cette hétérogénéité lors du fractionnement du sérum sur colonne de D.E.A.E.-cellulose, mais les fractions obtenues étaient plus complexes, rendant ainsi l'interprétation des résultats plus difficile.

A partir du précipité cuivrique, nous avons pu obtenir onze γ-globulines, de mobilités différentes, dont les cinq de mobilité plus lente à l'état pur.

Nous avons ainsi observé que la dernière fraction a une mobilité de α_1-globuline et qu'elle donne une réaction d'identité avec la première fraction (c'est-à-dire avec la plus lente). Par ailleurs, lorsque cette γ-globuline rapide

est injectée à des lapins, l'immunsérum obtenu contient des anticorps envers toutes les autres γ-globulines. Nous avons réalisé cette expérience avec la γ la plus rapide ; il est évident que les mêmes résultats sont obtenus avec les γ-globulines intermédiaires.

Le surnageant de précipitation cuivrique nous a permis d'obtenir la β_{2c}-globuline à l'état pur et d'identifier cette protéine à la sidérophiline. Nous avons pu ainsi caractériser cette protéine transporteuse de Fe qui ne peut être mise en évidence par les méthodes de détection directe sur des plaques. Le spectre d'absorption de cette protéine a été établi, ainsi que son contenu en Fe et sa capacité de saturation en ce métal.

L'haptoglobine a été identifiée à la α_2A-globuline. Une technique de caractérisation de cette protéine a été décrite et sa capacité de saturation en hémoglobine a été calculée.

L'électrophorèse préparative dans un tampon carbonate 0,05 M, pH 9,2, nous a permis d'obtenir l'albumine de Rat à l'état pur ainsi que le groupe des α_1-globulines.

Nous avons ainsi constaté que le ralentissement de la mobilité des α_1-globulines est une propriété typique de ces protéines qui, par ailleurs, ne sont pas dénaturées par ce traitement à pH 9,2. En effet, les α_1-globulines ainsi obtenues et dialysées contre un tampon véronal pH 8,2 migrent dans ce tampon comme dans le sérum total.

Une interaction des protéines avec la gélose est ainsi à écarter puisque ce même phénomène est observé avec d'autres supports.

Cette séparation des α_1-globulines et de l'albumine nous a également permis de déceler une nouvelle protéine, d'une mobilité nettement plus élevée que l'albumine, mais possèdant les propriétés des α_1-globulines. Nous l'avons appelée α_{1D}-globuline, une protéine analogue ayant été décrite dans le sérum humaine.

Signalons enfin que, lorsque l'électrophorèse est effectuée en agarose (une gélose très purifiée) et avec un pH de l'ordre de 7, les deux α_1-globulines principales (α_{1B} et α_{1D}) sont plus rapides que l'albumine et que les autres α_1-globulines sont plus lentes (au moins pour ce qui est de l'α_{1A} ou céruloplasmine et de l'α_{1C}-globuline ou estérase). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus, par d'autres auteurs, après électrophorèse en veine liquide et apportant une nouvelle propriété des α_1-globulines. De plus, ils indiquent qu'en gélose il existe malgré tout une interaction support-protéine, puisque cette dernière propriété n'est pas retrouvée en gélose-agar.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ANDERSON N.G., CANNING R.E., ANDERSON M.L. et SHELLHMER R.M. - Isolated cell component Rat-blood proteins. *Exp. Cell. Research, 16,* 292-308. (1958).

(2) ARNASON B.G., DE VAUX ST. CYR, Ch. et GRABAR P. - Immunoglobulin abnormalities of the thymectomized rat. *Nature, 199,* 1199-1200 (1963).

(3) BENJAMIN D.C. et WEIMER H.E. - The antigenic composition of Rat serum. An electrophoretic study. *J. Immunol., 91* , 331-339 (1963).

(4) CLAUSEN J. et HEREMANS J. - An immunologic and chemical study of the similarities between mouse and human serum proteins. *J. Immunol., 84* , 128-134 (1960).

(5) DARCY E.A. - A quantitative study of a serum proteins associated with tissue growth. Levels found in rats under various physiological conditions. *Brit. J. Cancer, 14,* 524-533 (1960).

(6) DEDONDER R. et PEAUD-LENOEL C. - Etudes sur la levane-sucrase. *Bull. Soc. Chim. Biol., 39,* 483-497 (1957).

(7) ENSELME J., TIGAUD J., LAMBERT R. et COTTEN J. - Recherches électrophorétiques sur les protéines du sérum de Rats. Etude statistique des résultats. *Bull. Soc. Chim. Biol., 36,* 1599-1609 (1954).

(8) ERLANG C., GESSING G. et CHANUTIN A. - An electrophoretic study of plasma and plasma fraction of normal and injured rats. *J. Biol. Chem., 169,* 657-665 (1947).

(9) ESCRIBANO M.J. - Emploi de l'acétate de cuivre pour la séparation des γ-globulines sériques. *Vox Sanguinis, 9,* 436-470 (1964).

(10) ESCRIBANO M.J. - Variations de la mobilité électrophorétique des α_1-globulines de sérum de Rat normal. *C.R. Ac. Sci., 255,* 409-411 (1962).

(11) ESCRIBANO M.J. et GRABAR P. - L'analyse immunoélectrophorétique du sérum de Rat normal. *C.R. Ac. Sci., 255,* 206-200 (1962).

(12) GRABAR P. et BURTIN P. - *in* "L'analyse immunoélectrophorétique" édit. P. GRABAR et P. BURTIN - Masson édit, (Paris), 1960 p. 6.

(13) GRABAR P. et COURCON J. - Analyse de sérums de souris, rat, lapin et cheval par l'analyse immunoélectrophorétique. *Bull. Soc. Chim. Biol., 40,* 1993-2003 (1958).

(14) GRABAR P. - Que sont les γ-globulines ? Propriétés physiques, chimiques et immunologiques. *Thérapie, 9,* 163-181 (1954).

(15) GRABAR P. - Nomenclature of serum proteins. *Nature, 197,* 692-693 (1963).

(16) GRABAR P. et WILLIAMS C.A. - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta, 10,* 195-194 (1953).

(17) GRABAR P. et WILLIAMS C.A. - Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta, 10,* 67-74 (1955).

(18) GRABAR P., URIEL J. et COURCON J. - L'analyse immunoélectrophorétique du sérum humain normal. V. Mobilités électrophorétiques. *Ann. Inst. Pasteur, 99,* 13-77 (1955).

(19) GOODMAN H.C., DE VAUX ST. CYR, Ch., CLEVE H. et GRABAR P. - Immunoélectrophoretic studies of human serum normal fractionated by anion exchange cellulose colum chromatography. *Prot. of Biol. Fluids* (Elsevier, Amsterdam), 1960 p. 135.

(20) GORNALL A.G., BARDEWILL Ch. J. et DAVID M.J. - Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem., 177,* 751-765 (1949).

(21) HERMANS J. - Les globulines sériques du système gamma. Bruxelles, Arscia édit., p. 39 (1960).

(22) HERMANS J., CLAUSEN J., HEREMANS M. Th. et RASK-NIELSEN R. - Immunoelectrophoretic characteristics of normal mouse serums as a basis for studying pathological changes in serums of mice carrying transplantable malignant growths. *J. Nat. Cancer Inst., 22,* 45-57 (1959).

(23) HERMAN G., TALAL N. DE VAUX ST CYR Ch. et ESCRIBANO M.J. - Immunoelectrophoretic study of rat serum and urinary esterases. *J. Immunol., 90* 246, 249 (1963).

(24) HIRSCHFELD J. - A simple method of determining haptoglobin groups in human serum by means of agar gel electrophoresis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., 47,* 169-172 (1959).

(25) HOLLMERG C.G. et LAURELL C.B. - Investigation in serum copper. Isolation of the copper containing protein and a description of some of its properties. *Acta Chem. Scand., 2,* 550-556 (1948).

(26) KABAT E.A. and MAYER M.M. - Experimental Immunochemistry. 2nd edition ; 1961 Thomas ed. Springfield, I 11. (USA) pp. 559-560.

(27) KAMINSKI M. et DURIEUX J. - Séparation des constituants l'ovalbumine par électrophorèse en gélose. *Bull. Soc. Chim. Biol., 38,* 1445-1450 (1956).

(28) LEVIN L. et LEATHEM J.H. - The relation of the pituitary thyroid and adrenal glands to the maintenance of normal serum albumin and globulin levels. *Am. J. Physiol., 136,* 306-313 (1942).

(29) MASSEYEFFE R., CAMERLYNCK P. et HOCQUET P.L. - Les protéines sériques du Cricetomys Gambianis Waterhouse. Etude par électrophorèse et immunoélectrophorèse en gel de gélose. *C.R. Soc. Biol., 153,* 1571-1575 (1960).

(30) MICHAELIS L. - *in* Histochemistry (Everson et Pearse édit.). Churchill, Londres, p. 781 (1960).

(31) MOORE D.H., LEAVEM L. et LEATHEM J.H. - Electrophoretic and salt fractionation of the serum proteins of normal and hypothyroid rat. *J. Biol. Chem., 153,* 349 (1944).

(32) NEAHUS O.W., BALEGNO H.F. et CHANDLER A.M. - Biochemical Significance of serum glycoproteins I. Charges in rat serum following injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107,* 960-964 (1961).

(33) NEAHUS O.W., HAVEZ R. et BISERTE G.F. - Fractionnement et identification des protéines sériques du Rat. *C.R. Soc. Biol., 156,* 1105-1112 (1963).

(34) OUCHTERLONY O. - Antigen-antibody reaction in gel. *Acta Path. Microb.* Scand., *26,* 507-515 (1949).

(35) PETERSON E.A. et SOBER H.A. - Variable gradient device for chromatography. *Anal. Chem., 31,* 857-862 (1959).

(36) POLONOWSKY M. et JAYLE M.F. - Peroxydases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique. *Bull. Soc. Chim. Biol., 21,* 48-66 (1939).

(37) ROBERT B., ROBERT L. et JAYLE M.F. - Les glycoprotéines sériques dans le granulome expérimental provoqué par la carrageemine. *Experienta, 15,* 385-387 (1959).

(38) SCHADE A.L. - Methods applicable to the study of siderophilin. *Behringwerk-Mitteilungen 39,* 130-150 (1961).

(39) SCHADE A.L., OYAMA J., REINHART R.W. et MILLER J.R. - Bound iron and unsaturated iron-binding capacity of serum, rapid and reliable quantitative determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87,* 443-448 (1954).

(40) SCHADE A.L. et CAROLINE L. - A non-binding component in human blood *Science, 104,* 340-341 (1946).

(41) SOBER H.A. et PETERSON E.A. - Protein Chromatography on ion-exchange cellulose. *Fed. Proc. 17,* 1116-1126 (1958).

(42) SCHEIDEGGER J.J. - Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Intern. *Arch. Allergy, 7,* 103-110 (1955).

(43) TISELIUS A. - Electrophoresis of serum globulin. *Biochem, J., 31,* 313-317 (1937).

(44) URIEL J. - Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. *Clin. Chim. Acta, 3,* 234-247 (1958).

(45) URIEL J. - *in* l'analyse immunoélectrophorétique (Grabar P. et Burtin P. éditeurs) Masson (Paris) pp. 39-40 (1960).

(46) URIEL J. et GRABAR P. - A new technique for direct detection of glycoprotines and polysaccharides after electrophoresis and immunoelectrophoresis in agar gel. *Analyt. Biochem., 2,* 80 (1961).

(47) URIEL J. - Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques d'après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. *Ann. Inst. Pasteur 101,* 104-119 (1961).

(48) URIEL J. - Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine humaine

après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. *Bull. Soc. Chim. biol.*, *39* suppl. 1, 105-118 (1957).

(49) URIEL J. et SCHEIDEGGER J. J. - Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *37*, 165-168 (1955).

(50) URIEL J. - Interaction entre des protéines sériques et des cations métalliques. *Biol. Med.*, p. 16 (1961).

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"STRUCTURE DES PROTEINES".

Vu et approuvé :
Paris, le 29 Décembre 1964
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean ROCHE

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN
Ouvrages scientifiques
TYPO-OFFSET
GAP (Hautes-Alpes)
Dépôt légal n° 285
1965